

Vol. 19, No. 1

JANUARY, 1934

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoken; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; OZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo
KIVOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

QP
501
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

Reprinted by
TOA BOOK EXPORTS, INC.

Tokyo Kosho Kaikan Building
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo
CABLE: Toaperiodical, Tokyo
PHONE: Tokyo 291-1448

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoken; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAVE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUVEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo
KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XIX

TOKYO

1934

COPYRIGHT 1934

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS TO VOLUME XIX.

No. 1, January, 1934.

	Page
ISEKI, Toshinori. Zur Kenntnis der Konstitution des Ovomukoides ...	1
ISEKI, Toshinori. Über einige Furanverbindungen der Barbitursäure..	7
KATAOKA, Eisei. Über das Verhalten der Methylprotocatechual- Barbitursäure im Kaninchenorganismus	11
KATAOKA, Eisei. Eine neue Glyzerinbestimmung	15
KATAOKA, Eisei. Chemische Zusammensetzung der Schweinethymus...	21
KATAOKA, Eisei. Vergleichende Untersuchung der chemischen Zusam- mensetzung des Pankreas	25
NAKAYAMA, Sadajiro. Zur Kenntnis des Diazoharns. III. Über die chemische Zusammensetzung des Diazoharns bei Scharlach	33
NAKAYAMA, Sadajiro. Zur Kenntnis des Diazoharns. IV. Über die chemische Zusammensetzung des Diazoharns bei Masern	39
KAGIYAMA, Sakae. Über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxyda- tions- und Reduktionsvermögens in den Geweben. (Fünfte Mitteilung.) Über den Einfluss der Keimdrüsen auf das Oxydations- und Reduktions- vermögen in den Geweben	45
KIYOHARA, K. und KAGIYAMA, S. Studien über die Gewebsatmung und die Indophenoloxidasereaktion der serösen Membranen	59
ABE, Minoru. The availability of fructose in the body of normal and diabetic animals	69
KOIKE, Tatsusaburo. Experimentelle Untersuchungen über die Bezie- hungen verschiedener Zuckerarten sowie zuckerbildender Substanzen zum Blutmilchsäurespiegel	111
HAYASHI, Katsuzo. Untersuchungen über elektrische Erscheinungen an der Hornhaut. I. Mitteilung: Die Potentialdifferenz der Hornhaut gegen Elektrolytlösungen	145
HAYASHI, Katsuzo. Untersuchungen über elektrische Erscheinungen an der Hornhaut. II. Mitteilung: Fortgesetzte Untersuchungen über Poten- tiale an der Hornhaut	165

No. 2, March, 1934.

HAYASHI, Katsuzo. Untersuchungen über elektrische Erscheinungen der Hornhaut. III. Elektrische Ladung der Hornhaut	173
IV. Der Isoelektrische Punkt d. Hornhaut und Schlussbetrachtung	185
TODA, Kuni. Über die Spaltung des Cholins im Organismus	201

INUTSUKA, Mamoru. Beiträge zur Kenntnis des Kohlenhydratstoffwechsels	217
TSUNOO, MACHIDA und KUSUI. Über die Abführwege der in der Leber produzierten Substanzen in die Blutbahn. I. Vergleichende Betrachtung d. Harnstoffgehaltes im Blute u. in der Lymphe	231
II. Vergleichende Betrachtung d. Zuckergehaltes in Blut, Lymphe und Galle	237
KURAMOTO, Tsuneo. Einfluss der Gallensäure auf die Wasserstoffionenkonzentration des Harns	245
MAKINO, Hiroshi. Beiträge zur Kenntnis der Taurocholsäure aus Fishgalle	249
SHIMADA, Jitsuichi. Studies in experimental scurvy. XVII. On the ability of glycuronic acid formation in the body of guinea pigs fed on a vitamin C free diet	253
XVIII. On the carbohydrate tolerance of guinea pigs fed on avitamin C free diet, and changes in the blood sugar content of the animals after the parenteral administration of adrenalin and insulin	257
NAKASHIMA, Teiji. Chemische Untersuchungen über die Entstehung des Naphtalin-Katarakte	281
KURAMOTO, Tsuneo. Beiträge zur Kenntnis der Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure	315
KAWABE, Kinji. Biochemical studies on carbohydrates. III. Micro-methode for determination of glucosamine in blood, tissue and urine...	319
MIYAZAKI, Masaki. Studies on secretagogues in gastric juice of dog..	329
TOMIYAMA, Tetuo and HANADA, Minoru. The distribution of methionine in several proteins of feeding-stuffs and casein	345
MASAMUNE, H. Biochemical studies on carbohydrates. IV. On an enzyme which catalyses the hydrolysis of biosynthetic osides of glucuronic acid	353

No. 3, May, 1934.

OGATA, Yusiro. Studien über Gaswechsel des Gewebes in Vitro. VI. Messung der Gewebsatmung und Glykolyse beim Auftreten des Ammoniakgases	377
ASAEDA, Jun-iti and SHEN, T. Paul. The Effect of adrenalin on the liver glycogen in adrenalectomized rabbits	391
HASEGAWA, Takurô. Über die Beziehung zwischen der Harnreaktion und der Magenacidität unter dem Einfluss der Gallensäure. I. Einfluss der Gallensäure auf die Ausscheidung des Kochsalzes, Kaliums und Natriums im Harn	403
TATEISHI, Chikara. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXIX. Die Zuckerausscheidungsschwelle unter dem Einfluss der Cholsäure und der Milz	409

Contents

v

KURAMOTO, Tsuneo. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Nucleinverdauung. II. Einfluss der Cholsäure auf den PH und die Phosphatausscheidung im Darmsaft	425
III. Einfluss der Cholsäure auf die Ausscheidungen von Na, K, Ca und Mg im Darmsaft	437
SUMIDA, Seichi. Durchblutungsversuche des Magens. IV. Mitteilung. Über Durchblutungsversuche des Magens mit Harnstoff	449
KUMAMI, Shiro. Über den Schwefelgehalt des Pankreasblutes und der Thoracicuslymphe. II. Mitteilung	457
DOI, Niraichi. Über den wahren Gewebszucker und das Glykogen, insbesondere über die Mikrobestimmung derselben	469
SUEYOSHI, Y. und OKONOGI, T. Über die Phosphorsäureverbindungen im Blut nach der Lecithininjektion	489

CHAPTER I

The first part of the book is devoted to a general survey of the history of the subject. It begins with a brief account of the early attempts to explain the origin of life, and then proceeds to a more detailed consideration of the various theories which have been advanced. The author then discusses the evidence in support of each theory, and finally arrives at his own conclusions. The second part of the book is devoted to a more detailed consideration of the various theories which have been advanced. The author then discusses the evidence in support of each theory, and finally arrives at his own conclusions.

The third part of the book is devoted to a more detailed consideration of the various theories which have been advanced. The author then discusses the evidence in support of each theory, and finally arrives at his own conclusions. The fourth part of the book is devoted to a more detailed consideration of the various theories which have been advanced. The author then discusses the evidence in support of each theory, and finally arrives at his own conclusions.

The fifth part of the book is devoted to a more detailed consideration of the various theories which have been advanced. The author then discusses the evidence in support of each theory, and finally arrives at his own conclusions. The sixth part of the book is devoted to a more detailed consideration of the various theories which have been advanced. The author then discusses the evidence in support of each theory, and finally arrives at his own conclusions.

ZUR KENNTNIS DER KONSTITUTION DES OVOMUKOIDES.

VON

TOSHINORI ISEKI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 7. August 1933)

Die strukturelle Ähnlichkeit des Chitins, einer tierischen Gerüstsubstanz, und des Mukoides, eines tierischen Schleimstoffes, erstreckt sich vor allem auf die allgemeine Form des Moleküls, nämlich auf die Anwesenheit von Chitosamin, das durch Vermittlung von Hauptvalenzen lange Ketten bildet.

Komori (1925) hat schon im hiesigen Institut zur Erforschung der Konstitution des Ovomukoides seine Bedeutung im Tierorganismus und die Verbreitung des Chitins verfolgt und er ist bei der tryptischen Verdauung des Ovomukoides auf eine Substanz gestossen, bei der es sich um ein acetyliertes Amino-polysaccharid zu handeln schien. Dabei blieb die Frage unbeantwortet, ob sich die Analogie mit dem Chitin auch auf die N-acetylierte Bindungsart der Bausteine erstreckt oder nicht.

Nachdem Y. Komori sein Verfahren zur Trennung des acetylierten Amino-Polysaccharides beschrieben hatte, war es geboten, dasselbe nach längerer Digestion anzuwenden; man durfte hoffen, auf diesem Wege noch einige Beimischungen von Aminosäuren beseitigen zu können. Bei dieser Untersuchung stellte ich mir noch zwei andere Aufgaben. Erstens prüfte ich, ob in der gesuchten Verbindung eine Ninhydrinreaktion gebende Atomgruppierung sich vorfindet; zweitens untersuchte ich die Substanz auf ihr Wesen durch die Biuretreaktion.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

I. Darstellung der Muttersubstanz des reduzierenden Körpers aus Ovomukoid durch Verdauung mit Trypsin.

200 g des gereinigten Ovomukoides wurden mit 2000 ccm Chloroformwasser und 40 g Trypsin nebst Toluol vermischt und unter Herstellung einer ganz schwach alkalischen Reaktion durch Ammoniak 250 Tage lang im Brutofen bei 37° verdaut. Das von den ausgeschiedenen weissen Tyrosinkristallen abfiltrierte Verdauungsprodukt wurde unter vermindertem Druck auf 500 ccm eingengt und von dem wieder auskristallisierten Tyrosin abfiltriert. Die Ausbeute an Tyrosin betrug 6,3 g.

Die Lösung wurde dann mit einer wässrigen Sublimatlösung gefällt. Man liess sie 12 Stunden stehen, filtrierte vom Niederschlag ab und fällte im Filtrate das gelöste Quecksilber mit Schwefelwasserstoff aus; filtrierte vom Schwefelquecksilber ab, entfernte den Schwefelwasserstoff, indem man Luft durch die Lösung durchsog, neutralisierte mit einer verdünnten Natronlauge und engte nun unter vermindertem Druck auf 500 ccm ein. Die Lösung wurde mit essigsaurem Blei gefällt. Das Filtrat wurde nun so lange mit Ammoniak versetzt, als noch ein Niederschlag entstand; diesen liess man sich gut absetzen, brachte ihn auf ein Filter und sog ihn sorgfältig ab.

Der mit Wasser 3 mal zerriebene und abgesaugte Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelwasserstoff befreite Lösung wurde zum Sirup eingengt und in absoluten Alkohol eingegossen; die entstandene weisse Fällung mit absolutem Alkohol und absolutem Äther gewaschen. Die so gereinigte schneeweisse, nicht hygroskopische Substanz wog 45,0 g.

II. Analyse der Substanz.

Komori's Substanz hat 4,6% Asche. Ihr N-Gehalt ist 7,55%. Meine Verbindung ist frei von Aminosäuren und viel weniger aschenhaltig.

1. Aschenbestimmung.

0,2148 g Substanz gaben 0,0010 g Asche, entsprechend
0,46% Asche.

2. Stickstoffbestimmung.

0,1517 g Substanz verbrauchten
5,8 ccm n/10-H₂SO₄, entsprechend 5,35% N.

3. Kohlen- und Wasserstoffbestimmungen.

0,0571 g Substanz gaben 0,0907 g CO₂ und 0,0351 g H₂O,
entsprechend 43,31% C und 6,87% H.

Auf aschenfreie Substanz berechnet:

C 43,51% H 6,90% N 5,37%.

III. Eigenschaften.

Die Substanz löst sich leicht in Wasser. In anderen organischen Solventien ist sie unlöslich, sowohl in der Kälte als auch in der Wärme.

Die wässrige Lösung dieser Substanz wird von Metallsalzen nicht gefällt, doch geben Bleiessig, und bei Ammoniakzusatz auch Bleizucker, einen Niederschlag. Von Alkohol wird die Lösung gefällt. Chlornatrium, Natriumsulfat und Ammoniumsulfat geben weder bei Zimmertemperatur noch bei Wärme, bis zur Sättigung zugeführt, Niederschläge.

Millon's Probe, Voisenetsche Reaktion und Schwefelblei-reaktion fallen negativ aus. Sie hat keine Ninhydrinreaktion. Wenn man aber die wässrige Lösung mit Salzsäure erhitzt, so zeigt die Lösung eine schöne Ninhydrinreaktion, woraus hervorgeht, dass ein Aminoaldehyd durch Säurehydrolyse frei wird. Bemerkenswerterweise zeigt die wässrige Lösung eine schöne Biuretreaktion. Die Tatsache, dass die Verbindung keine Ninhydrinreaktion, wohl aber die Biuretreaktion zeigt, deutet darauf, dass die Substanz nicht die Aminosäureverkettung bildet, sondern nach Tomita's (1931) Anschauung im Moleküle wenigstens eine freie Atomgruppe =C(-NH₂)-CH(OH)- hat.

Wenn man die wässrige Lösung mit Kali und Kupfervitriol

versetzt, so bekommt man eine hellblaue Fällung, welche sich beim Kochen nicht verändert.

Wenn man die wässrige Lösung mit verdünnter Mineralsäure erhitzt, so reduziert sie äusserst intensiv die Fehlingsche Lösung, sowie das Nylandersche Reagens, woraus hervorgeht, dass sich das 1-ständige Hydroxyl der Chitosamin-Moleküle an ihrer Verknüpfung beteiligt, welche Bindung durch Mineralsäure leicht gespalten wird.

IV. Spaltungsprodukte.

1. Bestimmung des Reduktionsvermögens, welches auf Traubenzucker berechnet wurde.

Um den höchsten Wert der reduzierenden Substanz zu bestimmen, habe ich nach Angabe Komoris die abgewogene Substanz mit einer abgemessenen Menge Salzsäure bestimmter Konzentration erhitzt. Das Reduktionsvermögen wurde nach Bertrand bestimmt. Folgendes ist das Resultat:

Substanzmenge g	H ₂ O Menge cem	HCl Menge cem	Erhitzungs- dauer Min.	Reduzierende Substanz auf Traubenzucker bezogen	
				mg	%
0,1482	5,0	5,0	5,0	73,26	49,43

2. Darstellung des hydrolytisch abspaltbaren Chitosamins.

3,70 g Substanz wurden 4 Stunden lang im Glycerinbad bei 110–120° unter Zusatz von 7,0 g Zinnchlorür mit 150,0 cem konzentrierter Salzsäure erhitzt; dann wurde mit Wasser verdünnt, das Zinn durch Schwefelwasserstoff beseitigt, das Filtrat eingeeengt und auf 200 cem aufgefüllt.

Mit 10 cem desselben wurde das Reduktionsvermögen nach Bertrand bestimmt. Für die Gesamtmenge ergab sich ein Gehalt von 1,004 g Chitosamin = 26,52% des Ausgangsmaterials.

Zur Darstellung von salzsaurem Chitosamin wurden 170 cem des oben erwähnten Filtrates auf dem Wasserbade bis zur Kristalli-

sation eingedampft. Das erhaltene Chitosaminchlorhydrat betrug 0,9578 g. Für die Gesamtmenge ergab sich ein Gehalt von 0,9364 g Chitosamin = 25,31%.

$$0,9578 \times \frac{179}{215,45} \times \frac{200}{170} = 0,9364.$$

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Als eine Fortsetzung von Komori's Arbeit habe ich die Muttersubstanz des reduzierenden Körpers aus Ovomukoid durch lange Verdauung mit Trypsin dargestellt.

2. Diese Verbindung ist noch spurweise aschenhaltig; sie ist frei von Aminosäuren.

3. Der Chitosamingehalt wurde zu 49,43% ermittelt.

4. Das 1-ständige Hydroxyl der Chitosamin-Moleküle beteiligt sich an ihrer Verknüpfung.

5. Auf Grund der Deutung der Biuretreaktion kann ein Vorhandensein der freien Atomgruppe $=C(-NH_2)-CHOH-$ angenommen werden.

Bromierung und acetolytische Untersuchung dieser Verbindung sind im Gang.

LITERATUR.

- Komori, Y. (1925): *Jl. of Biochem.*, **6**, 1.
Tomita, M. (1931): *H-S.*, **201**, 38.



ÜBER EINIGE FURANVERBINDUNGEN DER BARBITURSÄURE.

VON

TOSHINORI ISEKI.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 7. August 1933)

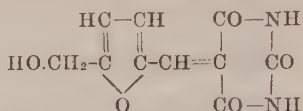
Bekanntlich hat E. Fischer in Gemeinsamkeit mit A. Dilthy (1904) schon vor 30 Jahren Veronal durch Einwirkung von Diäthylmalonester auf Harnstoff dargestellt. Seitdem ist man bestrebt, andere ähnliche Derivate zu synthetisieren und einige Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und schlaf-erregender Wirkung festzustellen.

Es schien uns nun von Interesse, einerseits die Alkylgruppe des Veronals durch verschiedene Atomkomponenten zu ersetzen und die schlafferregende Wirkung zu vergleichen, und andererseits das Schicksal der einzelnen Verbindungen im tierischen Körper zu verfolgen.

Da die Barbitursäure, wie bekannt, mit Aldehyden sehr leicht reagiert, so habe ich zunächst die Kondensation von Barbitursäure mit Oxymethylfurfurol oder Difurfurolmethyläther angestellt; das Verhalten der beiden letzteren im Tierorganismus ist im hiesigen Institut ausführlich untersucht worden (1927–1933). Durch Reduktion der Oxymethylfurfuralbarbitursäure kann man leicht Oxymethylfurfurylbarbitursäure synthetisieren, welche durch Behandlung mit Natriumalkoholat in die Natriumverbindung, dann durch Erhitzen mit einem passenden Halogenalkyl in eine substituierte Oxymethylfurfurylbarbitursäure übergeführt werden kann.

Meine Untersuchungen haben ergeben, dass die Oxymethylfurfuralbarbitursäure im Organismus der untersuchten Tiere stets leicht gespalten und dann oxydiert wird und als Oxymethylbrenzschleimsäure zu mehr als 15% in den Harn übergeht.

EXPERIMENTELLES.

1. *Darstellung der Oxymethylfurfuralbarbitursäure.*

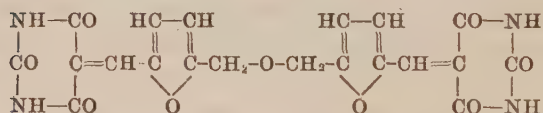
Eine Lösung von 6,5 g Barbitursäure in heissem Wasser wird mit 7,0 g Oxymethylfurfural versetzt, wobei sich die gesuchte Verbindung in Form eines pulverigen gelben Niederschlage abscheidet. Man digeriert den Kristall mit heissem Wasser, und der in Wasser unlösliche Körper wird mit Alkohol gewaschen. Die reine Substanz betrug 11,2 g, entsprechend 93,3% der Theorie.

0,1170 g Substanz verbrauchten 9,85 ccm n/10-H₂SO₄.

C₁₀H₈N₂O₅ Ber. N 11,86%

Gef. 11,78.

Die Substanz schmilzt bei 274° (unkorr.). In Wasser, Alkohol und Eisessig ist sie fast unlöslich.

2. *Kondensation des Di-(furfural-methyl-2)-Äther mit Barbitursäure zu Di-(barbituryl-furfural-methyl-2)-Äther.*

1,47 g Barbitursäure in heissem Wasser werden mit 0,95 g Di-(furfural-methyl-2)-Äther in 30%igem heissem Alkohol in einem Kölbchen zusammengebracht. Sofort scheidet sich ein gelblicher Niederschlag aus. Man digeriert die Masse mit Wasser, und der in Wasser unlösliche Körper wird mit Alkohol ausgewaschen. Die Ausbeute betrug 1,82 g, entsprechend 99,0% der Theorie.

0,1246 g Substanz verbrauchten 11,6 ccm n/10-H₂SO₄.

C₂₀H₁₄N₄O₉ Ber. N 12,34%

Gef. 12,29.

Die Substanz ist in Wasser, Alkohol und Eisessig unlöslich.

3. Fütterung von Oxymethylfurfuralbarbitursäure.

Die synthetisch dargestellte Oxymethylfurfuralbarbitursäure wurde in täglichen Dosen von 5–6 g Hunden und 1.0–1.5 g Kaninchen per os eingegeben. Der Harn der Versuchstiere wurde bei niedriger Temperatur zum Sirup verdampft. Der Sirup wurde mit erwärmtem 94%igem Alkohol extrahiert. Der nach Abdampfen des Alkohols erhaltene Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, mit Phosphorsäure angesäuert und dann mit Äther extrahiert. Aus dem Ätherextrakt schied sich nach dem Abdampfen des Äthers ein kristallinischer Körper aus. Durch Umkristallisieren aus Wasser mit Tierkohle bekam ich schöne Kristalle in Form von Nadelchen, welche bei 167° unter Gasentwicklung schmolzen.

I. 0,0547 g Subst.: 0,1028 g CO₂, 0,0208 g H₂O.

II. 0,0487 g Subst.: 0,0909 g CO₂, 0,0201 g H₂O.

C₆H₆O₄ Ber. C 50,69% H 4,26%

Gef. I. „ 51,24 „ 4,25

II. „ 50,90 „ 4,61.

Bei der Mischprobe mit der reinen Oxymethylbrenzschleimsäure zeigt sich keine Schmelzpunktsdepression.

Die Resultate der Fütterungsversuche von Oxymethylfurfuralbarbitursäure sind tabellarisch niedergelegt:

Tierarten	Gefütterte Menge g	Ausbeute von Oxymethylbrenzschleimsäure	
		g	%
Kaninchen	53,8	4,99	15,41
Hund	32,0	3,86	20,05

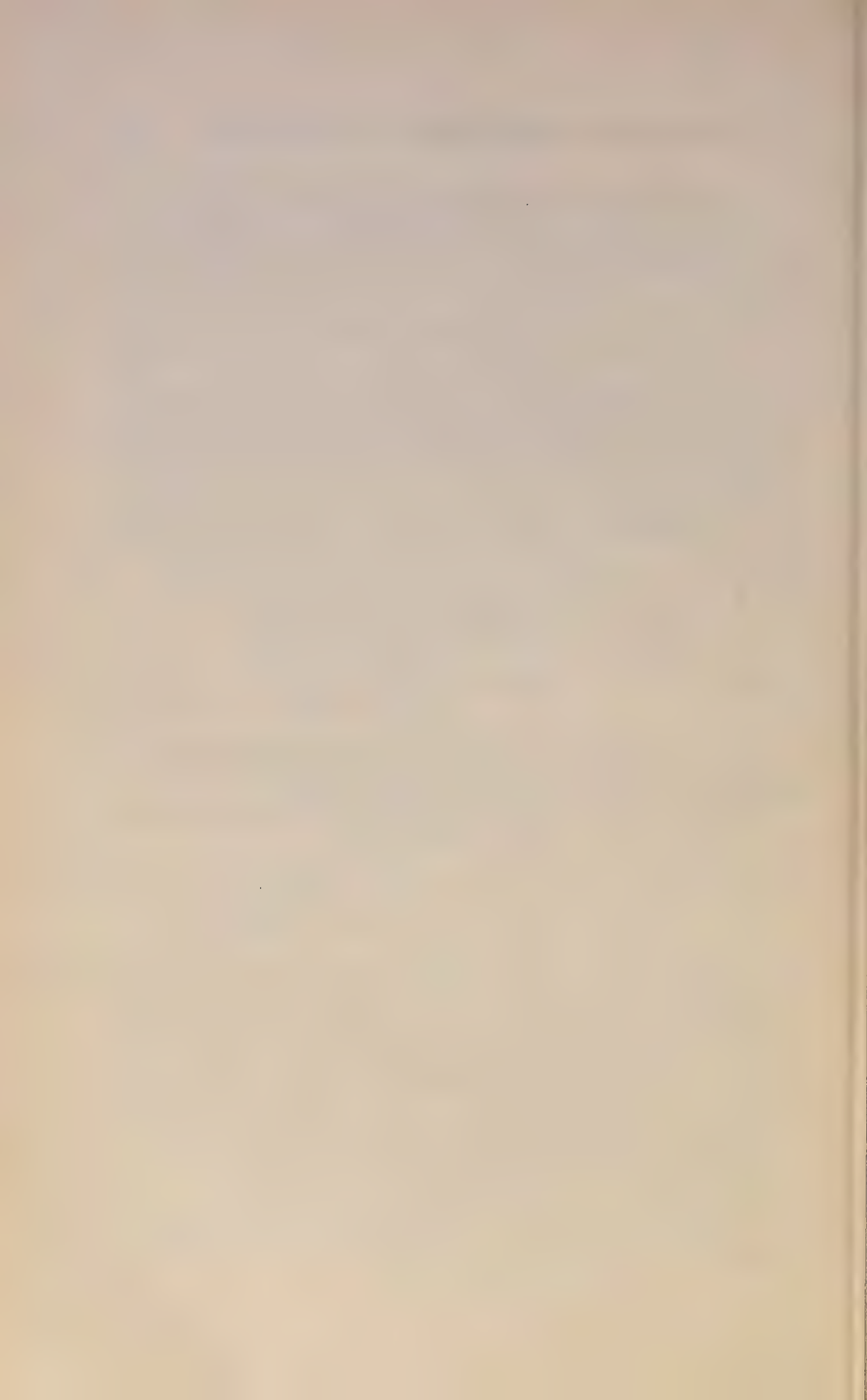
LITERATUR.

Fischer, E. und Dilthy (1904): Liebig's Ann., 335, 334.

Iseki, T. (1933): H-S., 216, 130.

Karashima, J. (1927): H-S., 169, 278.

Karashima, J. (1929): H-S., 180, 241.



ÜBER DAS VERHALTEN DER METHYL- PROTocatechual-BARBITURSÄURE IM KANINCHENORGANISMUS.

VON

EISEI KATAOKA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)

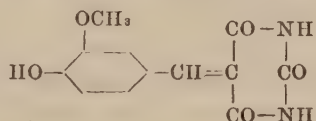
(Eingegangen am 7. August 1933)

Dass das verabreichte Vanillin im tierischen Organismus zu Vanillinsäure oxydiert wird und zum Teile als Ätherschwefelsäure und gepaarte Glukuronsäure im Harn auftritt, ist von Preusse (1877) und Kotake (1905) festgestellt worden.

Um das Schicksal der Barbitursäure-Verbindung des Vanillins zu verfolgen, habe ich in Fortsetzung der Experimente von Iseki nach seiner Methode die Methylprotocatechualbarbitursäure synthetisiert und sie an Kaninchen verfüttert. Meine Untersuchungen haben ergeben, dass die Methylprotocatechualbarbitursäure im Organismus des Kaninchens leicht gespalten und das Vanillin zu Vanillinsäure oxydiert wird.

EXPERIMENTELLE BELÄGE.

1. Darstellung der Methylprotocatechualbarbitursäure.



Eine heisse wässrige Lösung von 23 g Vanilin wird mit 20 g Barbitursäure in heissem Wasser versetzt, wobei sich eine gelbe Kristallmasse abscheidet. Man digeriert den Kristall mit Wasser, und der in Wasser unlösliche Körper wird aus heissem Methylalkohol unkristallisiert. Die reine Substanz betrug 39,0 g, entsprechend 98,4% der Theorie.

0,2000 g Substanz verbrauchten 14,5 ccm n/10 H_2SO_4 .

$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$

Ber. N 10,68%

Gef. 10,15%

Die Substanz ist in Wasser, Äther und Benzin unlöslich. In Aceton und Methylalkohol ist sie schwer löslich, löst sich jedoch in diesen Solventien in der Wärme. In Äthylalkohol ist sie löslich.

2. Verfütterung an Kaninchen.

Die synthetisch dargestellte Methylprotocatechualbarbitursäure wurde in täglichen Dosen von 2–3 g Kaninchen per os eingegeben. Der Harn der Versuchstiere wurde bei niedriger Temperatur zum Sirup verdampft. Der Sirup wurde mit Alkohol extrahiert. Der nach Abdampfen des Alkohols erhaltene Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure angesäuert und dann mit Äther extrahiert. Aus dem Ätherextrakt schied sich nach dem Abdampfen des Äthers eine Kristallmasse aus. Sie wurde aus Wasser mit Tierkohle umkristallisiert. Im ganzen wurden 41,0 g gegeben. Aus dem Harn konnte ich 4,9 g reine Substanz erhalten, welche bei 207° schmolz.

Auf Grund der Analyse und des Schmelzpunktes wird die Substanz als mit Vanillinsäure identisch angenommen.

0,1028 g Substanz brauchten 6,4 ccm n/10 NaOH bei der Titration.

0,0938 g Substanz brauchten 5,8 ccm n/10 NaOH bei der Titration.

0,0607 g Substanz gaben 0,1286 g CO_2 und 0,0276 g H_2O .

$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ Ber. C 57,12% H 4,80% Mol.-Gew. 168

Gef. 57,77 5,01 160,6

161,7

Die Säure löst sich schwer in kaltem, leichter in heissem Wasser. Sie ist in Alkohol und Äther leicht löslich.

3. Vergleich der Oxydation des Vanillins und der Vanilinbarbitursäure im Tierorganismus.

Zur Entscheidung der Frage, ob die Oxydationsvorgänge des Vanillins im Tierorganismus durch die Spaltung der Barbitursäure beeinflusst werden oder nicht, habe ich eine äquivalente Menge

Vanillin Kaninchen unter gleichen Bedingungen eingegeben; der Harn der Versuchstiere wurde in gleicher Weise auf Vanillinsäure bearbeitet. Im ganzen wurden 23,7 g Vanillin (äquivalent zu 41,0 g Methylprotocatechualbarbitursäure) gegeben, und 4,78 g Vanillinsäure aus dem Harn isoliert.

Die Oxydation des Vanillins in freier Form und in der Barbitursäureverbindung verläuft also in gleicher Weise.

LITERATUR.

Iseki, T. (1934): *J. of Biochem.*, **19**, 7.

Kotake, Y. (1905): *H-S*, **45**, 320.

Preusse (1877): *H-S*, **4**, 213.

EINE NEUE GLYZERINBESTIMMUNG.

VON

EISEI KATAOKA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 7. August 1933)

Zum qualitativen Nachweis des Glycerins dient bekanntlich der beim raschen Erhitzen auftretende unangenehme, charakteristische Geruch nach Akrolein, der auch beim Erhitzen der Glyceride entsteht. Wenn man also unter geeigneten Bedingungen imstande ist, das gebildete Akrolein quantitativ zu fassen, so kann das ursprüngliche Glycerin leicht berechnet werden.

Aus diesem Grunde habe ich eine einfache, in jedem Laboratorium brauchbare Methode der Glycerinbestimmung entworfen. Mein Verfahren beruht auf der Überführung des Glycerins durch Kochen mit Kaliumbisulfat in Akrolein, dessen Dampf in eine gemischte Lösung von Bertrand I und II eingeleitet wird. Das dabei entstehende Kupferoxydul wird nach Bertrand in Ferrosulfat übergeführt und mit Kaliumpermanganat titriert. Dieses Verfahren erfordert folgende Apparate:

1) Zersetzungseprouvette A von 18 cm Länge und 2,2 cm Durchmesser.

2) Eine Abdampfungsvorrichtung, wie sie in umstehender Zeichnung (Abb. 1) abgebildet ist: die unter 1 erwähnte Epruvette A mit 2 Glasröhren, die eine (a) mit dem Hahn (c) zum Kohlensäureentwickler und die andere (b) in schräger Lage liegende mit Vorlage (B) verbunden.

I. AUSFÜHRUNG DER BESTIMMUNG.

Man bringt genau abgewogenes Glycerin und die 20fache Menge Kaliumbisulfat in das Reagenzglas und verbindet dieses mit dem a- und b-Rohr. Das an das vordere Ende des Rohrs b mittels Gummischlauchs angefügte Glasrohr d führt in den Kolben

B. In dieser Vorlage hat man schon vorher je 20 cem Bertrand I und II Lösung eingebracht. Das Rohr e führt zur Wasserstrahlpumpe. Zunächst leitet man Kohlensäure 3–5 Minuten lang in A, um die Luft zu verdrängen. Man lässt dann das Rohr d in die Flüssigkeit im Kolben B eintauchen und schliesst den Hahn(C). Jetzt erhitzt man den Boden des Reagenzglases A, unter dem ein Asbestnetz, das ihn kaum berührt, befestigt ist. Nach halbstündigem Erhitzen verdrängt sich der Inhalt des Reagenzglases in einen weisslichen Klumpen. 5 Minuten lang leitet man danach durch Hahn c Kohlensäure zu und spritzt die innen und aussen am Rohr b und d hängende Flüssigkeit mit der Spritzflasche in den Kolben B zurück.

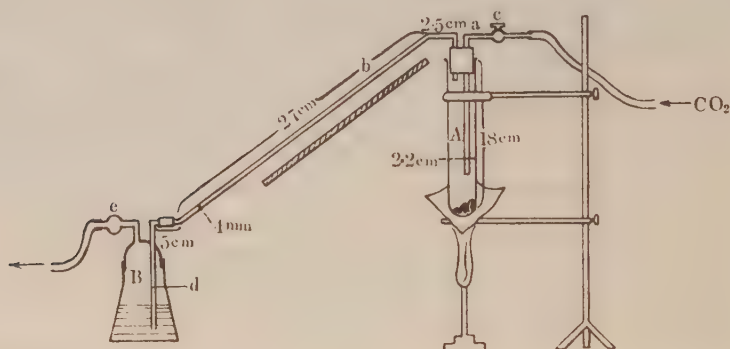


Abb. 1.

Die Titration des entstehenden Kupferoxyduls wird nach dem Bertrand'schen Verfahren ausgeführt. Man rechnet zunächst unter Benutzung des oben erhaltenen Wertes die Anzahl Kupfermilligramme aus, welche den verbrauchten Kubikzentimetern Permanganatlösung entsprechen, und erfährt weiter aus der Tabelle I die entsprechende Menge Glycerin:

Die Abhängigkeit von x , der Anzahl Milligramme des Glycerins, und y , der des Kupfers, ist in Fig. 1 graphisch dargestellt worden. Auf der Abszisse ist x , auf der Ordinate y angegeben.

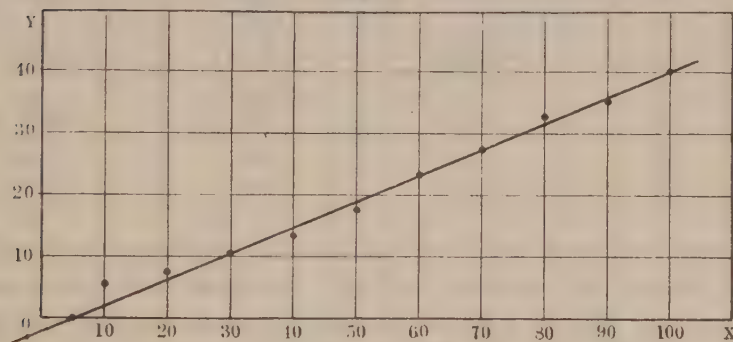
Aus der obigen Linie lässt sich folgende Formel ableiten:

$$\text{(Formel A)} \quad y = 0,42 x - 2,2$$

TABELLE I.

Glycerin g	Zugesetztes KHSO ₄ g	Kupfer mg
0,00	0,2	4,607
0,01	0,2	5,235
0,02	0,4	7,329
0,03	0,6	10,470
0,04	0,8	13,611
0,05	1,0	17,799
0,06	1,2	23,034
0,07	1,4	27,222
0,08	1,6	32,457
0,09	1,8	36,645
0,10	2,0	40,833

Fig. 1.



Vergleicht man nun die nach der Formel A berechneten Werte mit den direkt von mir gemessenen, so findet man eine annähernde Übereinstimmung zwischen den beiden Werten:

Ist also der Wert y festgestellt, so lässt sich der Wert x leicht nach der folgenden Formel berechnen:

$$(Formel B) \quad x = 2,380 y + 5,238$$

II. BESTIMMUNG DES GLYCERINS IN DEN GLYCERIDEN NACH DIESEM VERFAHREN.

Um die Frage zu entscheiden, ob das Glycerin im Glycerid-

TABELLE II.

x mg	y mg		
	Die durch Messungen erhaltenen Werte	Die nach der Formel A berechneten Werte	Differenz
20	7,329	6,2	-15,4%
25	—	8,3	
30	10,470	10,4	- 0,0%
35	—	12,5	
40	13,611	14,6	+7,2%
45	—	16,7	
50	17,799	18,8	+5,5%
55	—	20,9	
60	23,034	23,0	- 0,0%
65	—	25,1	
70	27,222	27,2	- 0,0%
75	—	29,3	
80	32,457	31,4	- 3,2%
85	—	33,5	
90	36,645	35,6	- 2,8%
95	—	37,8	
100	40,833	39,8	- 2,5%

moleküle sich nach dem oben geschilderten Verfahren bestimmen lässt, verfuhr ich zunächst wie folgt: Ich brachte eine bestimmte Menge von reinen β -Stearodipalmitin und die 2,2fache Menge Kaliumbisulfat (beinahe 20fache Menge des Glycerins) in das Reagenzglas A und arbeitete wie oben erwähnt weiter.

Die folgende Tabelle gibt die Übersicht der erhaltenen Ergebnisse:

Die Abhängigkeit von x , der Anzahl Milligramme des Glycerins im β -Stearodipalmitin, und y , der Anzahl Milligramme des Kupfers, wird durch Fig. 2 wiedergegeben.

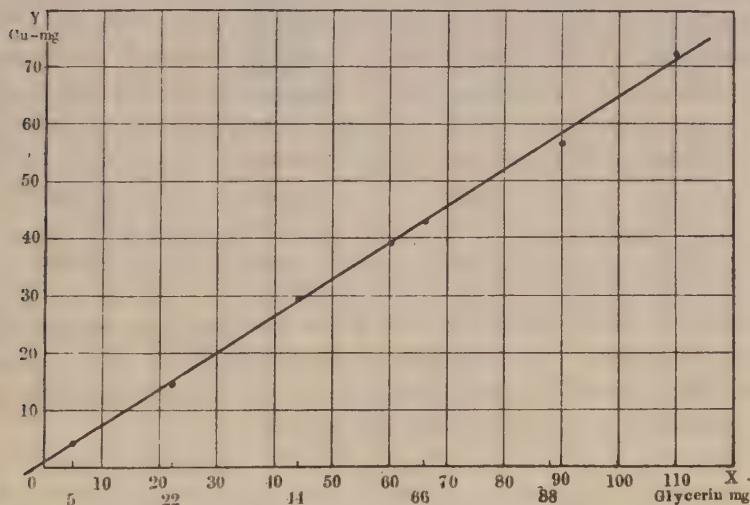
Aus der Betrachtung der Linie findet man mithin für die Berechnung von y folgende Formel:

$$(\text{Formel C}) \quad y = 0,633 x + 1$$

TABELLE III.

β -Stearodipalmitin g	Glycerin g	Zugesetztes KHSO ₄ g	Kupfer mg
0,05	0,005	0,11	4,607
0,20	0,022	0,44	14,658
0,40	0,044	0,88	29,316
0,60	0,066	1,32	42,927
0,80	0,088	1,76	56,538
1,00	0,110	2,20	72,243

Fig. 2.



Wie aus umstehender Tabelle zu ersehen ist, stimmen die nach der Formel C berechneten Werte für x mit den durch die Messungen erhaltenen beinahe überein:

Ist also der Wert y festgestellt, so lässt sich der Wert x leicht nach der folgenden Formel berechnen:

$$(\text{Formel D}) \quad x = 1,58 \, y - 1,58$$

Wie aus Tabelle I und III zu ersehen ist, ist die Anzahl Kupfermilligramme bei der Glycerinbestimmung mit β -Stearo-

TABELLE IV.

x mg	y mg		
	Die durch Messungen erhaltenen Werte	Die nach der Formel C berechneten Werte	Differenz
5	4,607	4,165	+9,5%
10	—	7,330	
20	—	13,660	
22	14,658	14,926	+1,8%
30	—	19,990	
40	—	26,320	
44	29,316	28,852	-1,6%
50	—	32,650	
60	—	38,980	
66	42,927	42,778	-0,3%
70	—	46,310	
80	—	51,640	
88	56,538	56,704	-0,2%
100	—	64,300	
110	72,243	70,630	-2,2%

dipalmitin immer höher als die Werte bei der Bestimmung mit reinem Glycerin. Ich unterlasse es, an dieser Stelle näher darauf einzugehen, inwiefern diese Methode für die Glycerinbestimmung der Neutralfette von Gültigkeit ist.

CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER SCHWEINETHYMUS.

VON

EISEI KATAOKA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 7. August 1933)

Da die chemischen Stoffe, aus welchen sich die Zelle zusammensetzt, einerseits die Grundlage der in der Zelle verlaufenden chemischen Vorgänge bilden und andererseits die Organisationsanlage bei den verschiedenen tierischen Körpern begründen, so verlohnt es der Mühe, die chemische Zusammensetzung der einzelnen Organe bei den verschiedenen Tierarten vergleichend zu untersuchen.

Nachdem schon J. Karaschima (1928) im hiesigen Institut aus der Rinderthymus das reine β -Stearo-Dipalmitin dargestellt hat, habe ich nunmehr die chemische Untersuchung der Schweinethymus unternommen.

EXPERIMENTELLES.

1659 g Thymus aus 218 Schweinen wurden zerkleinert, mittels eines starken Luftstromes getrocknet und in einem Soxhlet'schen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert.

Die ätherlöslichen Anteile wurden dann mit kaltem Aceton behandelt, und die aus der acet unlöslichen Fraktion ausgeschiedenen Kristalle wurden aus warmem Alkohol umkristallisiert. Die Mengenverhältnisse von Wasser, Fettstoffen und fettfreien Substanzen sind kurz zusammengestellt wie folgt:

1659 g frische Thymus

Wasser	1063,5 g	(64,1%)
Trockensubstanz	595,5 g	(35,9%)

{	fettfreie Subst.	440,65 g	(26,6%)
	Fettstoffe	154,85 g	(9,3%)
	{		
	acetonlöslicher Teil		141,0 g
	acetonunlöslicher Teil		13,85 g

I. DARSTELLUNG DES α -PALMITO-DISTEARINS.

Der Ätherextrakt der trocknen Thymus wurde verdunstet und mit kaltem Aceton extrahiert. Die aus dem Acetonextrakt beim Abkühlen auf 0° ausgeschiedenen Kristalle wurden dann mit warmem Alkohol aufgenommen. Beim Abkühlen schied sich aus dieser Alkohollösung ein weisser Nadelkristall aus, welcher noch 2mal aus warmem Alkohol umkristallisiert wurde. Die Ausbeute betrug 24,5 g (4,1% der Trockenthymus).

A. Eigenschaften.

Die Substanz ist in Äther, Petroläther, Benzol, Toluol, Chloroform und Schwefelkohlenstoff leicht löslich. In Essigäther, Äthyl-, Methyl- und Amyl-Alkohol und Aceton ist sie fast unlöslich. Bei gelinder Wärme wird sie aber mit den erwähnten Lösungsmitteln sehr leicht extrahiert. Sie schmilzt bei 63,5°. Unter bestimmten Bedingungen hat sie Doppelschmelzpunkte von 50° und 63,5°. Stickstoff, Phosphor und Schwefel sind nicht nachweisbar. Cholesterinreaktion ist negativ.

B. Analyse.

I. Elementaranalyse.

0,0544 g Substanz gaben 0,1535 g CO₂ und 0,0599 g H₂O.

C₅₅H₁₀₆O₆ Ber. C 76,49% H 12,38%

Gef. 76,94 12,31

II. Ermittlung der Verseifungszahl.

0,3624 g Substanz verbrauchten n/2-KOH 2,55 ccm

Berechnet für ein Palmito-Distearin 195,05

Gefunden 197,4

Die Substanz zeigt weder Säurezahl noch Jodzahl.

C. Spaltungsprodukte.

Das aus diesem Glycerid durch Verseifung mit Kalilauge erhaltene Fettsäuregemisch hat den Schmelzpunkt von 63,5°. Dieser Schmelzpunkt entspricht nach der von Heintz (1854) aufgestellten Tabelle einem Gehalt von 30% Palmitinsäure und 70% Stearinsäure. Auf diese Weise wird die angenommene Zusammensetzung ebenfalls bestätigt. Die Säurezahl dieses Fettsäuregemisches wurde bestimmt.

0,4395 g Substanz verbrauchten n/2-KOH 3,2 ccm.

Berechnet für ein Gemisch von 1 Mol Palmitinsäure und 2 Mol Stearinsäure:

204,1

Gefunden

204,2

Um die Glycerinmenge zu bestimmen, wurden 1,5248 g Glycerid mit Natriumalkoholat nach Kossel und Obermüller (1890-1) verseift. In glycerinhaltiger wässriger Lösung wurde der Glyceringehalt nach C. Mangold (1891) bestimmt.

1,5248 g Substanz verbrauchten n/5-KMnO₄ 17,1 ccm.

Glyceringehalt des Palmito-Distearins Ber. 10,67%

Gef. 10,31

II. PROTEINSTOFFE.

60 g der trocknen fettfreien Substanz wurden mit Schwefelsäure hydrolysiert und das Hydrolysat auf Hexonbasen verarbeitet. Andererseits wurden 160 g derselben Substanz mit Salzsäure hydrolysiert und aus dem Salzsäurehydrolysat Monoaminosäuren isoliert. Die Trennung der Hexonbasen geschah nach dem Kossel und Kutscherschen Verfahren. Das Arginin und Lysin wurden als Pikrat und das Histidin als Pikrolonat kristallinisch dargestellt. Monoaminosäuren wurden nach Fischers Estermethode isoliert. Die Gesamtmenge der aus Schweinethymus isolierten Aminosäuren betrug für 100 g Material:

Glykokoll	—
Alanin	1,19 g
Valin	0,81
Leucin	3,24

Isoleucin	1,28	
<i>l</i> -Prolin	0,57	
<i>dl</i> -Prolin	0,27	
Phenylalanin	0,01	
Glutaminsäure	}	2,80
Asparaginsäure		
Serin		
Lysin	1,58	
Arginin	2,00	
Histidin	0,21	

ZUSAMMENFASSUNG.

1. In der Schweinethymus wurde α -Palmito-Distearin rein kristallinisch isoliert.

2. Unter den Proteinbausteinen ist das quantitative Überwiegen der basischen Diaminosäuren und des Leucins bemerkenswert. Glykokoll liess sich keines nachweisen.

LITERATUR.

- Heintz (1854): Liebigs Ann. der Chem., **92**, 295.
 Karaschima, J. (1928): Jl. of biochem., **10**, 183.
 Kossel u. Obermüller (1890-1): H-S., **14**, 599; **15**, 321.
 Mangold, C. (1891): Zitiert nach Hofmeister u. Lenz (1892):
 Zeitschr. f. analyt. Chem., **31**, 718.

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER CHEMISCHEN ZUSAMMENSETZUNG DES PANKREAS.

VON

EISEI KATAOKA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 7. August 1933)

Jedes Studium physiologischer Vorgänge, von welchen Gesichtspunkten auch immer es ausgehen möge, führt notwendigerweise zur Betrachtung des Protoplasmas. Auch ein vergleichend-biochemisches Studium im Bereiche der verschiedenen Formen tierischer Organisation muss naturgemäss auf eine Betrachtung des Protoplasmas und seiner chemischen Konstitution zurückgreifen. Die Erforschung der chemischen Zusammensetzung des Protoplasmas muss sicherlich als eine der wichtigsten Aufgaben der Physiologie bezeichnet werden, wenn man auch auf der anderen Seite sich vor einer Überschätzung der auf dem Wege der chemischen Analyse einer Lösung zugänglichen Probleme zu hüten hat.

Wenn ein Organ morphologisch und physiologisch heterogen ist, so müssen sein histologisches Bild und seine chemische Konstitution, je nach der Veränderung der physiologischen Wirkung des Organs, nicht stets dieselben sein, sondern Veränderungen erfahren. Die chemische Zusammensetzung eines bestimmten Organs muss sich in einigem Parallelismus zu den morphologischen Verschiedenheiten verhalten. Bekanntlich besitzt das Pankreas einerseits eine exkretorische und andererseits eine inkretorische Funktion. Man hat durch Unterbindung der Ausführungsgänge der Pankreasdrüse erreicht, dass die sezernierenden Zellen mit der Zeit zugrunde gingen, während die von Langerhans entdeckten Gewebsteile in Funktion blieben. Man kann dabei mit Recht erwarten, dass die chemische Zusammensetzung der Pankreasdrüse vor und nach der Operation nicht dieselbe ist. Vielleicht kann

man auf diese Weise zur Kenntniss der chemischen Konstitution des Insulins einen Beitrag liefern.

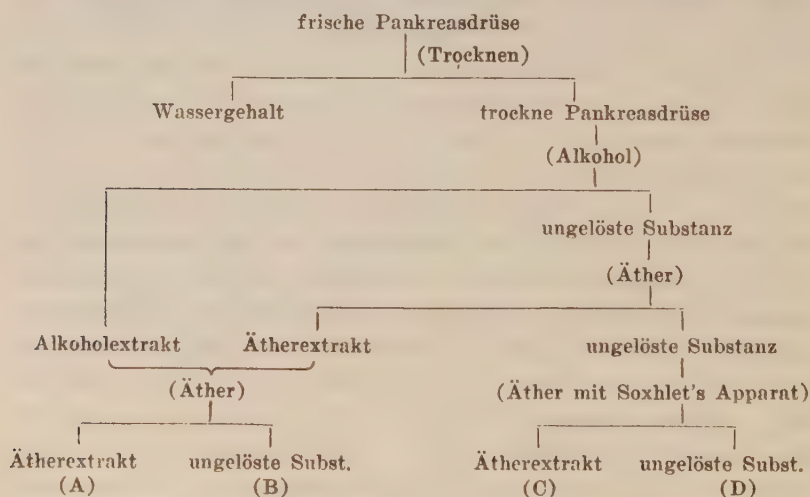
Von diesem Gesichtspunkt ausgehend, habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Tomita die vergleichende Untersuchung der chemischen Zusammensetzung der normalen Pankreasdrüse unternommen, deren Resultate im folgenden mitgeteilt werden.

I. UNTERSUCHUNG DER FETTSTOFFE.

A. Menge und Eigenschaften der Fettsubstanzen der Pankreasdrüse.

Die Pankreasdrüse eines frisch getöteten Rindes oder Schweins wurde möglichst schnell vom Schlachthofe bezogen. Die vom Blut, Fett- und Bindegewebe befreite Drüse wurde sofort gewogen, dann zerkleinert und mittels eines starken Luftstromes getrocknet, welcher das auf einem Porzellanteller in dünner Schicht liegende Material beblies. Das getrocknete Material wurde mit Äther und Alkohol extrahiert.

Die äther-alkohollöslichen Fraktionen wurden als Fettsubstanz behandelt, und aus den ungelösten Teilen die Proteinstoffe analysiert. Die Fraktionierung geschah in der folgenden Weise:



Die Tierarten, das Geschlecht, das Alter der Tiere, die Zahl

und das Gewicht des verwendeten Materials und die Mengenverhältnisse von Wasser, Fettstoffen und fettfreien Substanzen sind kurz in Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I.

Tierarten	Alter (Jahre)	Geschlecht	Zahl der verwendeten Pankreasdrüsen	Gewicht der frischen Drüsen g	Wassergehalt		Trockensubstanz			
							Fettfreie Substanz		Fettstoffe	
					g	%	g	%	g	%
Schwein	unbekannt	♂	10	669,8	458,6	68,5	135,4	20,2	75,8	11,3
„		♀	10	738,0	513,3	69,5	146,7	19,9	77,9	10,6
Rind	1-4	♂	5	786,0	559,9	71,2	123,8	15,8	102,3	13,0
„	5-7	♂	5	1330,5	987,8	74,2	188,8	11,6	153,9	14,2
„	8-12	♂	5	852,7	601,3	70,5	167,7	19,7	83,7	9,8
„	1-4	♀	5	924,0	642,9	69,5	159,5	17,3	121,6	13,2
„	5-7	♀	5	793,4	547,3	69,0	115,0	14,5	130,7	16,5
„	8-12	♀	5	1265,0	924,5	73,1	220,0	17,4	120,5	9,5

Die Löslichkeit jeder Fraktion der äther-alkohol-löslichen Anteile und ihre Menge wurden kurz in Tabelle II zusammengestellt:

TABELLE II.

Tierarten	Alter (Jahre)	Geschlecht	Zahl der verwendeten Pankreasdrüsen	Gesamtmenge der Fettstoffe g	Fraktion		
					Alkohol 1.1 Aether 1.1 (A) g	Alkohol 1.1 Aether w.1 (B) g	Alkohol w.1 Aether 1. (O) g
Schwein	unbekannt	♂	10	75,8	31,5	26,1	18,2
„		♀	10	77,9	27,3	33,9	16,8
Rind	1-4	♂	5	102,3	36,4	22,6	43,3
„	5-7	♂	5	153,9	30,3	82,7	40,9
„	8-12	♂	5	83,7	29,8	38,8	15,1
„	1-4	♀	5	121,6	42,8	20,0	58,8
„	5-7	♀	5	130,7	39,8	47,0	43,9
„	8-12	♀	5	120,5	39,8	32,2	48,5

Die A-Fraktion muss freie Fettsäuren, Fett und Cholesterin enthalten. Aus der C-Fraktion wurden ziemlich leicht kristalline Glyceride isoliert. Um gewisse Anhaltspunkte über die Zusammensetzung beider Fraktionen zu erhalten, wurden die sogenannten Kennzahlen ermittelt. Dabei zeigte sich folgendes Resultat (vgl. Tabelle III):

TABELLE III.

Tierarten	Alter (Jahre)	Geschlecht	Fraktion	Kennzahlen				
				Säurezahl	Verseifungszahl	Reichert-Meißl's Zahl	Polenske's Zahl	Jodzahl
Schwein	unbekannt	♂	A	43,48	181,10	0,849	0,551	63,25
			C	40,45	185,96	1,049	1,283	65,42
"	"	♀	A	45,72	180,45	0,970	0,692	65,72
			C	45,60	186,49	1,003	1,171	69,15
Rind	1-4	♂	A	45,29	183,90	0,840	0,986	56,42
			C	80,57	193,10	0,495	1,337	40,15
"	5-7	♂	A	52,54	181,50	1,199	1,229	59,60
			C	86,43	190,31	0,360	1,117	46,90
"	8-12	♂	A	55,17	181,85	0,920	1,027	56,96
			C	67,33	196,57	0,744	1,352	44,86
"	1-4	♀	A	42,76	186,10	0,910	1,118	54,27
			C	79,95	195,02	0,716	1,966	39,05
"	5-7	♀	A	41,10	183,85	0,714	0,835	53,53
			C	86,16	194,86	0,709	1,260	39,37
"	8-12	♀	A	46,14	180,25	1,004	1,991	56,91
			C	91,37	185,36	0,532	1,234	45,84

Es fällt auf, dass in der C-Fraktion des Rinderpankreas doppelt so viele freie Fettsäuren vorhanden sind als in derselben Fraktion des Schweinepankreas.

B. Darstellung der kristallinen Glyceride.

Die obige C-Fraktion wurde im Eisschrank abgekühlt. Die dabei ausgeschiedenen Kristalle wurden mit auf 45–50° erwärmtem 85%igem Alkohol aufgenommen. Bei Zimmertemperatur schieden sich aus dieser Alkohollösung weisse Nadelkristalle aus. Diese Kristalle wurden 2mal aus auf 45–50° erwärmtem absolutem Alkohol und eventuell aus warmem Aceton umkristallisiert.

Aus Rinderpankreas wurde β -Stearo-Dipalmitin analysenrein

isoliert. Aus Schweinepankreas bekam ich dagegen ein bei 65° schmelzendes Glycerid. Auf Grund der bei den Elementaranalysen erhaltenen Zahlen glaube ich, das aus dem Schweinepankreas abgeschiedene Glycerid als β -Lauro- α -Distearin betrachten zu dürfen.

Die Menge der kristallinisch ausgeschiedenen Glyceride, ihr Schmelzpunkt sowie die Doppelschmelzpunkte werden in Tabelle IV angegeben:

TABELLE IV.

Tierarten	Alter (Jahre)	Geschlecht	Zahl der verwendeten Pankreasdrüsen	Menge der C-Frakt. g	Menge der kristall. Glyceride g	Schmelzpunkt	
						stabil	doppelt
Schwein	unbekannt	♀	10	16,5	0,75	65°	51° 65°
Rind	1-4	♂	5	43,3	2,40	59,5	49 59,5
„	5-7	♂	5	40,9	0,51	59,5	49 59,5
„	1-4	♀	5	58,8	2,22	59,5	49 59,5
„	5-7	♂	5	43,9	3,26	59,5	49 59,5
„	8-12	♀	5	48,5	0,42	57	48 57

I. β -STEARO-DIPALMITIN AUS RINDERPANKREAS.

A. *Eigenschaften.* Die Substanz ist in Äther, Benzol, Toluol, Schwefelkohlenstoff, Petroläther, Benzin und Chloroform leicht löslich. In kaltem Pyridin, Äthyl- und Methylalkohol, Aceton und Essigäther ist sie fast unlöslich. Bei gelinder Wärme wird sie aber mit den erwähnten Lösungsmitteln leicht extrahiert.

Stickstoff, Phosphor und Schwefel sind nicht nachweisbar. Cholesterinreaktion ist negativ.

B. Elementaranalyse.

0,1459 g Substanz gaben 0,4092 g CO₂ u. 0,1572 g H₂O.

C₅₃H₁₀₂O₆ Ber. C 76,18% H 12,32%

Gef. „ 76,49 „ 12,06

C. Ermittlung der Verseifungszahl.

0,3325 g Substanz verbrauchten n/2 KOH 2,42 ccm.

0,2203 g	„	1,58 ccm.
0,2658 g	„	1,93 ccm.
Ber. für ein 1 Stearodipalmitin		201,6
Gef.		204,6, 201,6, 203,7.

Die Substanz zeigt weder Säurezahl noch Jodzahl.

D. Spaltungsprodukte. Das aus diesem Glycerid durch Verseifung mit Kalilauge erhaltene Fettsäuregemisch hat den Schmelzpunkt von 55,3°. Dieser Schmelzpunkt entspricht nach der von Heintz (1854) aufgestellten Tabelle einem Gehalt von 32,5% Stearinsäure und 67,5% Palmitinsäure. Auf diese Weise wird die angenommene Zusammensetzung ebenfalls bestätigt. Die Säurezahl dieses Fettsäuregemisches wurde geeicht.

0,5203 g Substanz verbrauchten n/2-KOH	3,9 ccm.
Ber. für ein Gemisch von 1 Mol. Stearinsäure und 2 Mol. Palmitinsäure:	211,2
Gef.	210,25

Um die Glycerinmenge zu bestimmen, wurden 4,7313 g Glycerid mit Natriumalkoholat nach Kossel und Obermüller (1890–1) verseift. In der glycerinhaltigen wässrigen Lösung wurde der Glyceringehalt nach C. Mangold (1891) bestimmt.

4,7313 g Substanz verbrauchten n/10-KMnO ₄	111,0 ccm.
Glyceringehalt des Ssearodipalmitins	Ber. 11,03%
	Gef. 10,79

II. β -LAURO- α -DISTEARIN AUS SCHWEINEPANKREAS.

A. Eigenschaften. Die Löslichkeit des Glycerides ist genau so wie die des β -Stearo-Dipalmitins.

Stickstoff, Phosphor und Schwefel sind nachweisbar. Cholesterin ist negativ.

B. Elementaranalyse.

0,1134 g Substanz gaben 0,3157 g CO ₂ u. 0,1247 g H ₂ O.	
C ₅₁ H ₉₈ O ₆	Ber. C 75,86% H 12,24%
	Gef. „ 75,92 „ 12,30

C. Ermittlung der Verseifungszahl.

0,0996 g Substanz verbrauchten n/2-KOH 0,76 ccm.

0,1036 g Substanz verbrauchten „ 0,77 ccm.

Ber. für ein 1 Laurodistearin 208,6

Gef. 214,3, 208,7.

II. PROTEINSTOFFE.

50 g der Trockensubstanz der D-Fraktion (Äther und Alkohol unlöslich) wurden jedesmal mit Schwefelsäure hydrolysiert, und das Schwefelsäurehydrolysat wurde auf Hexonbasen verarbeitet. Andererseits wurden jedesmal 160 g derselben Substanz mit Salzsäure hydrolysiert und aus dem Hydrolysate die Monoaminosäuren nach Fischers Estermethode isoliert. Bei der Untersuchung der Hexonbasen habe ich das Verfahren von Kossel und Kutscher angewandt und das Arginin und Lysin als Pikrat, das Histidin als Pikrolonat getrennt. Die Gesamtmenge der aus Rinder- und Schweinepankreas isolierten Aminosäuren ist in Tabelle V kurz zusammengestellt.

TABELLE V.

Aminosäuren	Schweinepankreas		Rinderpankreas	
	♂	♀	♂	♀
Lysin	3,94%	3,01%	3,56%	2,89%
Arginin	2,33	2,54	2,45	2,60
Histidin	0,39	0,35	0,61	0,62
Glykokoll	0,03			0,03
d-Alanin	0,35			0,82
Valin	2,19			0,64
Leucin	5,34			5,44
Isoleucin	0,28			0,31
l-Prolin	0,68			0,54
dl-Prolin	0,38			0,25
Glutaminsäure	1,23			1,93
Asparaginsäure	0,77			0,26
Serin	0,11			0,09

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Bei beiden Tierarten (Schwein und Rind) zeigte sich kein auffallender Unterschied in den Eiweissbausteinen der Pankreasdrüse.

In quantitativer Hinsicht ist das Überwiegen des Leucins und der basischen Diaminosäuren unter den Proteinbausteinen bemerkenswert.

2. In dem Rinderpankreas wurde β -Stearo-Dipalmitin rein kristallinisch isoliert. Es wurde in dem Schweinepankreas nicht aufgefunden, dagegen ein Glycerid, welches als β -Lauro- α -Distearin angenommen werden kann.

LITERATUR.

Heintz (1854): Liebigs Ann. der Chem., **92**, 295.

Kossel u. Obermüller (1890-1): H-S., **14**, 599; **15**, 321.

Mangold, C. (1891): Zitiert nach Hofmeister u. Lenz (1892):
Zeitschr. f. analyt. Chem., **31**, 718.

ZUR KENNTNIS DES DIAZOHARNS.

III. Über die chemische Zusammensetzung des Diazoharns bei Scharlach.

VON

SADAJIRO NAKAYAMA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 7. August 1933)

Paul Ehrlich, der die Diazo-Reaktion im Jahre 1882 im Urine eines Typhuskranken entdeckte, hatte bewiesen, dass sie nicht auf Zersetzungsprodukte im Darmkanal zurückzuführen ist, und er unternahm bereits Versuche um dem Produkt, das im Urin mit Diazoniumsalz kuppelt, auf die Spur zu kommen.

Seitdem sind viele Hypothesen über die Reaktion ausgesprochen worden, ohne dass exakte Beweise geliefert und eine Übereinstimmung mit den chemischen Tatsachen erzielt wurde.

Um in das Dunkel, das den Chemismus der Diazoreaktion umhüllt, zu leuchten, ist es notwendig, den unbekannten Stoff oder die unbekannten Stoffe in irgendeiner kristallisierten und analysierbaren Form zu erhalten, sei es als Chromogen selbst oder als Derivat desselben.

Leo Hermanns (1926) machte die Erfahrung, dass der Diazoprobe kein einheitlicher chemischer Stoff zugrunde liegt, sondern dass den verschiedenen Krankheiten auch verschiedene Ausscheidungsprodukte im Urin zukommen. Von diesen gelang es ihm drei Produkte in Form der betreffenden Azofarbstoffe, nämlich als Oxyindol-, Oxykresol- und Kumaronderivat, zu fassen. Die Diazoreaktion beruht also nach ihm auf der Ausscheidung phenolartiger Substanzen, die je nach der Krankheit verschieden sind und wahrscheinlich einer toxischen Gewebsschädigung ihre Entstehung verdanken.

In jüngster Zeit konnte P. Sachs (1932) aus Diazoharn einen

kristallinen Dichlorazobenzolfarbstoff isolieren. Er konnte ferner aus dem Farbstoffe zweierlei Benzoylderivate gewinnen, und er vermutete, dass das Chromogen vielleicht mit dem von Kotake (1931) gefundenen Kynurenin in Zusammenhang gebracht werden kann.

Andererseits ist im hiesigen Institut seit Jahren die Antoxyproteinsäure des Diazoharns untersucht worden, die zum ersten Mal von Bondzynski (1905) aus normalem Menschenharn isoliert wurde. Komori (1926) und Sendju (1927) haben sich davon überzeugt, dass diese Säure an der Diazoreaktion des Harns bei Phthisis und Typhus wesentlich beteiligt ist.

Um näheren Aufschluss über die chemische Natur der Diazoreaktion des pathologischen Harns zu erlangen, habe ich nun das Studium des Diazoharns bei Scharlach unternommen, dessen Ergebnisse im folgenden mitgeteilt werden sollen.

Experimentelles.

9,7l des Diazoharns bei Scharlach wurden mit Essigsäure schwach angesäuert, auf dem Wasserbade bis zu dünnem Sirup eingedampft und so lange mit Bleiessig versetzt, bis keine Fällung mehr auftrat. Das Filtrat und die Waschwässer wurden vereinigt, unter vermindertem Druck bei 40° eingeeengt, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, und das Filtrat von Bleisulfat in vacuo eingeeengt. Diese Lösung wurde mit kaltgesättigtem Barytwasser versetzt, bis die Flüssigkeit deutlich alkalische Reaktion zeigte. Der überschüssige Baryt wurde durch Kohlensäure beseitigt, und die unter vermindertem Druck stark eingeeengte Lösung dann tropfenweise in absoluten Alkohol eingegossen. Der entstandene weisse Niederschlag wurde abgenutscht und mit absolutem Alkohol gewaschen. Diese Alkoholfällung wurde zur Trennung der Antoxyproteinsäure sowie Oxyproteinsäure benutzt, und das Filtrat zur Isolierung von Aminosäuren reserviert.

I. TRENNUNG DER ANTXYPROTEINSÄURE.

Die Alkoholfällung wurde in Wasser gelöst, von dem Baryum durch verdünnte Schwefelsäure befreit, mit Essigsäure schwach

angesäuert und dann mit 20%iger Lösung von Quecksilberacetat versetzt, und zwar so lange, als sie noch eine Fällung erzeugte; es entstand ein sehr reichlicher weisser Niederschlag. Nach einigen Tagen wurde der Niederschlag abgenutscht und mit 20%iger Quecksilberacetatlösung sorgfältig ausgewaschen. Dieser bei essigsaurer Reaktion durch Quecksilberacetat gefällte Niederschlag diente zur Darstellung der Antoxyproteinsäure. Der Niederschlag wurde in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus der vom Quecksilbersulfid abfiltrierten Lösung wurde durch Eindampfen unter vermindertem Druck der Schwefelwasserstoff vertrieben; die Lösung wurde weiter zu dickem Sirup eingedampft, und dann in absoluten Alkohol unter Umrühren eingegossen. Dabei wurden anorganische Salze als weisse Niederschläge gefällt; die Antoxyproteinsäure musste im Filtrate von dieser Fällung gesucht werden. Das alkoholische Filtrat wurde in vacuo unter Zusatz von Schwefelsäure verdampft, um die darin enthaltene Essigsäure zu vertreiben. Der Sirup wurde dann in Wasser gelöst, mit lauwarmem Barytwasser gesättigt und unter vermindertem Druck stark eingedampft. Diese Behandlung wurde mehrmals wiederholt, um das Ammoniak vollständig zu verjagen. Nach der Beseitigung des Barytüberschusses mit Kohlensäure, sowie dem Einengen der Flüssigkeit in vacuo bis zur Sirupkonsistenz wurde die Antoxyproteinsäure durch Eingiessen in absoluten Alkohol als Bariumsalz gefällt. Der Niederschlag wurde schnell abgesaugt und mit absolutem Alkohol sowie Äther getrocknet. Die gewonnene Substanz, die noch hygroskopisch war, wurde nochmals in Wasser gelöst, der Baryt mit Schwefelsäure ausgefällt, das Filtrat vom Bariumsulfat bei schwefelsaurer Reaktion unter vermindertem Druck stark eingedampft und dann in konzentrierten Alkohol eingegossen. Auf Grund ihrer leichten Löslichkeit in Alkohol, wurde die freie Antoxyproteinsäure in dem Alkoholauszuge gesucht, und sie konnte von den in Alkohol schwer löslichen Salzen getrennt werden. Zur weiteren Reinigung der Substanz wurde die aus dem Alkoholauszuge erhaltene Antoxyproteinsäure nochmals nach der oben beschriebenen Methode als Bariumsalz gefällt; dasselbe wurde nun in Wasser gelöst, mit

Schwefelsäure angesäuert, von Erdalkalisulfaten abfiltriert und dann in vacuo zu dünnem Sirup eingengt, mit Schwefelsäure versetzt, bis der Prozentgehalt 5% betrug, und dann mit konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Die nach einigen Tagen abgesaugten Phosphorwolframsäure-Niederschläge der Antoxyproteinsäure wurden mit 5% iger Schwefelsäure gewaschen und in einer Reibschale mit überschüssigem Ätzbaryt zerrieben; dabei ging die Antoxyproteinsäure als Bariumsalz in die Lösung über. Das Filtrat wurde in bekannter Weise mit Kohlensäure behandelt, und das Filtrat vom Bariumcarbonat unter vermindertem Druck zu dickem Sirup eingedampft und dann in absoluten Alkohol eingegossen. Das dabei entstandene Bariumsalz der Antoxyproteinsäure wurde durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Umfällen mit Alkohol zur Analyse gereinigt, worauf es schliesslich mit Äther nachgespült und im Vakuumexsiccator getrocknet wurde. Die Gesamtausbeute an Bariumsalz dieser Säure betrug 10,0 g.

Diese Substanz zeigt Schwefelbleireaktion, gibt jedoch keine Biuret- und Xanthoproteinreaktion. Beim Kochen mit einer grossen Menge Millonschem Reagens zeigt sie keine Rotfärbung. Die Ehrliche'sche Diazoreaktion ist stark positiv. Beim Erwärmen mit verdünnter Salzsäure spaltet der Schwefelwasserstoff ab.

0,2385 g Substanz gaben 0,1142 g $\text{BaSO}_4 = 0,06714 \text{ g Ba}$;
entsprechend 28,15% Ba.

Es unterliegt also keinem Zweifel, dass diese Substanz, mit der Angabe von Bondzynski und Dombrowski (1905) übereinstimmend, dem antoxyproteinsauren Barium entspricht.

II. OXYPROTEINSÄURE.

Nach dem Abtrennen der Antoxyproteinsäure aus essigsaurer Lösung mit Quecksilberacetat, wurde die Lösung mit kaltgesättigter Natriumcarbonatlösung neutralisiert und weiter mit Sodalösung so lange versetzt, als noch ein weisser Niederschlag ausfiel. Mit dem Erscheinen eines gelben Niederschlags wurde die Fällung unterbrochen. Diese Fällung bestand hauptsächlich aus dem Quecksilbersalz der Oxyproteinsäure. Das Filtrat wurde zur Isolierung von Aminosäuren reserviert. Der abgesaugte Nieder-

schlag wurde in Wasser suspendiert und durch Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Quecksilbersulfid unter vermindertem Druck zum Sirup eingedampft und dann mit absolutem Alkohol versetzt, um die anorganischen Salze zu beseitigen. Zur Entfernung der Essigsäure wurden nun die alkoholischen Auszüge unter Zusatz von Schwefelsäure in vacuo verdampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit lauwarmem Barytwasser übersättigt. Das Filtrat vom Bariumsulfat wurde dann mit Kohlensäure behandelt. Nun wurde das Filtrat vom Bariumcarbonat unter vermindertem Druck stark eingeeengt und in absoluten Alkohol eingegossen. Dabei fielen weisse, nicht besonders hygroskopische Niederschläge aus, welche zum grössten Teil aus dem Bariumsalze der Oxyproteinsäure bestanden. Durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Umfällen mit Alkohol wurde das Bariumsalz zur Analyse gereinigt, schliesslich mit Äther nachgespült und im Vakuumexsiccator getrocknet. Es wog 1,6 g.

0,1250 g Substanz, verbrannt nach Kjeldahl, verbrauchten 8,6 ccm n/10- H_2SO_4 ; entsprechend 9,63% N.

Diese Verbindung zeigt weder Ehrlichsche Diazoreaktion noch Biuretreaktion. Die Schwefelbleiprobe ist positiv.

III. TRENNUNG DER AMINOSÄUREN.

Das bereits beschriebene Filtrat von der Alkoholfällung der Antoxy- und Oxyproteinsäure und das Filtrat von dem Quecksilbersalz der Oxyproteinsäure wurden vereinigt, das gelöste Quecksilber mit Schwefelwasserstoff beseitigt, die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit dann unter vermindertem Druck stark eingeeengt. Der darin reichlich enthaltene Harnstoff wurde durch Urease zerlegt, das Filtrat in vacuo stark eingeeengt und mit absolutem Alkohol ausgezogen. Die alkoholischen Auszüge wurden wieder unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand in 5% H_2SO_4 gelöst und mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Diese Niederschläge dienten zur Trennung der Hexonbasen, und das Filtrat wurde zur Bearbeitung der Monoaminosäuren benutzt. Bei der Untersuchung der Hexonbasen wurde das Verfahren von Kossel und Kutscher (1900) angewandt, und das Arginin und

Lysin wurde als Pikrat, das Histidin als Pikrolonat isoliert. Wegen Mangels an Untersuchungsmaterial wurden die Monoamino-säuren zusammen als Kupfersalz isoliert, und die Stickstoffmenge wurde nach Kjeldahl bestimmt.

Die Gesamtmenge der aus 9,7l Diazoharn bei Scharlach isolierten Antoxyproteinsäure, Oxyproteinsäure und Aminosäuren ist im folgenden zusammengestellt.

Antoxyproteinsäure	7,18 g
Oxyproteinsäure	1,07 g
Histidin	0,02 g
Arginin	0,08 g
Lysin	0,25 g
N-Gehalt der Monoaminosäuren	0,56 g

LITERATUR.

- Bondzynski und Dombrowski (1905): H-S., **46**, 83.
 Hermanns, L. (1926): Deutsch. Arch. f. klin. Mediz., **152**, 153.
 Komori, Y. (1926): Jl. of Biochem., **6**, 297.
 Kossel und Kutscher (1900): H-S., **31**, 165.
 Kotake, Y. (1931): H-S., **195**, 139.
 Sachs, P. (1932): Z. f. klin. Mediz., **119**, 381.
 Sendju, Y. (1927): Jl. of Biochem., **7**, 311.

ZUR KENNTNIS DES DIAZOHARNS.

IV. Über die chemische Zusammensetzung des Diazoharns bei Masern.

VON

SADAJIRO NAKAYAMA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät zu Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 7. August 1933)

Über das chemische Prinzip der Diazoreaktion und die Isolierung der als Ursache dieser Reaktion angesehenen Substanzen stellte bereits Paul Ehrlich mehrere Untersuchungen an. Er hat zunächst Metallsalzfällungen angewandt und ein Zinksalz isoliert, das wegen seiner Unbeständigkeit nicht analysiert und daher nicht näher charakterisiert werden konnte.

Auf Grund der Erfahrungen, die Bondzynski und Dombrowski (1905) bei ihren Untersuchungen über die Proteinsäurefraktion des Urins machten, gibt die Antoxyproteinsäure die typische Diazoreaktion. Ob diese Säure derjenige Körper ist, welcher die in verschiedenen Krankheiten beobachtete charakteristische Färbung des Harns mit den Diazoreagentien gibt, ist bis jetzt noch nicht entschieden.

Um zu prüfen, ob sich Beziehungen zwischen dieser Säure und der Diazoreaktion des Harns feststellen lassen, muss eine genauere chemische Untersuchung von verschiedenen pathologischen Urinen durchgeführt werden, die die Farbenreaktion geben.

Nachdem Y. Komori (1926) und Y. Sendju (1927) im hiesigen Institut sich davon überzeugt hatten, dass die Antoxyproteinsäure an der Diazoreaktion des Harns bei Phthisis und Typhus abdominalis sehr wesentlich beteiligt ist, gelang es mir, aus dem Diazoharn bei Scharlach reichliche Antoxyproteinsäure zu isolieren. Anknüpfend an diese Beobachtung habe ich eine Reihe von Analysen des Diazoharns bei Masern angestellt, deren

Ergebnisse im folgenden mitgeteilt werden.

Experimentelles.

6,8l Diazoharn bei Masern wurden bei schwachsaurer Reaktion stark eingeengt und so lange mit Bleiessig versetzt, bis keine Fällung mehr auftrat. Nach dem Entbleien des Filtrats mit Schwefelsäure wurde die Flüssigkeit mit lauwarmem Barytwasser deutlich alkalisch gemacht, und das von dem Bariumsulfat abgetrennte Filtrat mit Kohlensäure von dem überschüssigen Baryt befreit. Nun wurde die klare Flüssigkeit unter vermindertem Druck stark eingeengt und dann tropfenweise in absoluten Alkohol eingegossen. Der voluminöse weisse Niederschlag wurde abgenutscht und dann mit absolutem Alkohol gewaschen. Zur Trennung der Proteinsäure wurde diese Alkoholfällung nach dem Verfahren von Bondzynski und Mitarbeitern behandelt und das Filtrat zur Isolierung der Aminosäuren benutzt.

I. ALKOHOLFÄLLUNG.

(Trennung der Antoxy- und Oxyproteinsäure.)

Die Alkoholfällung wurde in Wasser gelöst, von dem Barium durch verdünnte Schwefelsäure befreit, das Filtrat mit Essigsäure schwach angesäuert und dann so lange mit 20%iger Quecksilberacetatlösung versetzt, bis keine Fällung mehr auftrat. Nach einigen Tagen wurde der Niederschlag abgesaugt und mit 20%iger Quecksilberacetatlösung sorgfältig ausgewaschen. Der Niederschlag wurde als A und das Filtrat als B behandelt.

A. *Quecksilberacetatniederschlag bei essigsaurer Reaktion.*

(Trennung der Antoxyproteinsäure.)

Zur Darstellung der Antoxyproteinsäure wurde der bei saurer Reaktion ausgefallene Quecksilberniederschlag abgenutscht, gründlich ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus der vom Quecksilbersulfid abfiltrierten Lösung wurde durch Eindampfen unter vermindertem Druck der Schwefelwasserstoff vertrieben; sie wurde dann weiter zu dickem Sirup eingedampft und dann in absoluten Alkohol unter Umschütteln eingegossen. Das alkoho-

lische Filtrat von den ausgefällten anorganischen Salzen wurde durch Vakuumdestillation unter Zusatz von Schwefelsäure von Essigsäure befreit. Der Sirup wurde nun in Wasser gelöst, mit lauwarmem Barytwasser gesättigt, und die Antoxyproteinsäure nach dem Ausfällen des Barytüberschusses mit Kohlensäure sowie der Konzentration der Flüssigkeit in vacuo bis zur Sirupkonsistenz durch Eingiessen in Alkoholäthergemisch als Bariumsalz gefällt. Da die erhaltenen Präparate noch Chlor enthielten, wurden sie zuerst mit Tierkohle entfärbt und weiter durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Umfällen mit einem Alkoholäthergemisch zur Analyse gereinigt, worauf sie schliesslich mit Äther nachgespült und im Vakuumexsiccator getrocknet wurden. Die gewonnene Substanz wurde wieder in Wasser gelöst, und das von dem Barium mit verdünnter Schwefelsäure befreite Filtrat in vacuo zu dünnem Sirup eingeengt, mit Schwefelsäure versetzt, bis der Prozentgehalt 5% betrug, und dann mit konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Die nach einigen Tagen abgesaugten Phosphorwolframsäureniederschläge wurden mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen und in einer Reibschale mit überschüssigem Atzbaryt und lauwarmem Barytwasser zerrieben; dabei ging die Antoxyproteinsäure als Bariumsalz in die Lösung über. Das Filtrat wurde in bekannter Weise mit Kohlensäure behandelt, und das Filtrat vom Bariumcarbonat unter vermindertem Druck zu dickem Sirup eingeengt und dann in absoluten Alkohol eingegossen. Das entstandene Bariumsalz der Antoxyproteinsäure wurde durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Umfällen mit Alkohol gereinigt und dann mit Äther nachgespült. Die Gesamtausbeute an Bariumsalz dieser Säure betrug 6,5 g.

0,0598 g Substanz gaben 6,9 cem N (21°, 759 mm)

N=13,05%

Diese Substanz gibt keine Biuret- und Xanthoproteinreaktion. Wohl aber zeigt die Substanz in minimaler Menge eine deutliche Ehrlichsche Diazoreaktion. Die Analyse ergab einen Wert, der mit dem des antoxyproteinsauren Bariums übereinstimmt. Seine Eigenschaften stimmten auch mit denen des Präparates von Bondzynski und Dombrowski (1905) vollständig überein.

B. Quecksilberacetatniederschlag aus dem antoxyproteinsäure-freien Filtrate bei sodaalkalischer Reaktion.

(Trennung der Oxyproteinsäure.)

Nach dem Abtrennen der Antoxyproteinsäure aus essigsaurer Lösung mit Quecksilberacetat wurde das Filtrat mit kaltgesättigter Natriumcarbonatlösung neutralisiert, und weiter mit Sodalösung so lange versetzt, bis ein gelber Niederschlag erschien. Die Fällung bestand nun zum grössten Teil aus dem Quecksilbersalz der Oxyproteinsäure.

Das Filtrat wurde mit dem bereits erwähnten Filtrat von der Alkoholfällung (I) vereinigt und zur Darstellung der Aminosäuren verwendet. Der abgesaugte Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die dadurch frei gewordene Säure nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs zur Beseitigung der anorganischen Salze mit Alkohol ausgezogen. Zum Entfernen der Essigsäure wurden nun die alkoholischen Auszüge unter Zusatz von Schwefelsäure in vacuo verdampft und dann in Bariumsalz umgewandelt. Die Ausbeute betrug 4,5 g.

0,1268 g Substanz, nach Kjeldahl verbrannt, verbrauchten 9,34 ccm n/10- H_2SO_4 ; entsprechend 10,31%.

Die Eigenschaften des Präparates stimmten mit denen des Präparates von Bondzynski und Gottlieb (1905) überein.

II. FILTRAT VON DER ALKOHOLFÄLLUNG.

(Trennung der Aminosäuren.)

Das Filtrat von der Alkoholfällung (I) und das Filtrat von dem Quecksilbersalz der Oxyproteinsäure wurden vereinigt, das gelöste Quecksilber mit Schwefelwasserstoff beseitigt, und die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit dann unter vermindertem Druck stark eingengt. Der darin reichlich enthaltene Harnstoff wurde durch Urease zerlegt, das Filtrat in vacuo stark eingengt und mit absolutem Alkohol ausgezogen. Die alkoholischen Auszüge wurden wieder unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand in 5% H_2SO_4 gelöst und mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Diese Niederschläge dienten zur Trennung der Hexonbasen.

Die Phosphorwolframsäureniederschläge wurden mit Baryt zerlegt, und die weitere Bearbeitung für die quantitative Bestimmung der Hexonbasen geschah nach dem Vorschlag von Kossel und Kutscher (1900). Es ergab sich folgendes:

Histidin	0,08 g (als Pikrolonat)
Arginin	0,32 g (als Pikrat)
Lysin	0,55 g (als Pikrat).

Wegen Mangels an Untersuchungsmaterial wurden die Monoaminosäuren nicht untersucht.

Die Gesamtmenge der aus 6,8 l Diazoharn bei Masern isolierten Antoxyproteinsäure, Oxyproteinsäure und Hexonbasen ist im folgenden zusammengestellt worden.

Antoxyproteinsäure	...	6,5 g (als Ba-Salz)
Oxyproteinsäure	4,5 g (als Ba-Salz)
Histidin	0,08 g (als Pikrolonat)
Arginin	0,32 g (als Pikrat)
Lysin	0,55 g (als Pikrat).

LITERATUR.

- Bondzynski und Dombrowski (1905): H-S., **46**, 83.
 Bondzynski und Gottlieb (1905): zitiert in H-S., **46**, 97.
 Komori, Y. (1926): JI. of Biochem., **6**, 297.
 Kossel und Kutscher (1900): H-S., **31**, 165.
 Nakayama, S. (1933): voranstehend.
 Sendju, Y. (1927): JI. of Biochem., **7**, 311.

ÜBER DIE GESCHLECHTLICHEN UNTERSCHIEDE DES OXYDATIONS- UND REDUKTIONS- VERMÖGENS IN DEN GEWEBEN. (Fünfte Mitteilung)

Über den Einfluss der Keimdrüsen auf das Oxydations- und Reduktionsvermögen in den Geweben.

VON

SAKAE KAGIYAMA.

(Aus dem physiologischen Institut der Fakultät zu Nagasaki.
Direktor: Prof. Dr. D. Ogata.)

(Eingegangen am 8. August, 1933)

EINLEITUNG.

Die Keimdrüsen wirken bekanntlich nicht nur auf die Geschlechtsfunktion, sondern auch auf den allgemeinen Stoffwechsel, und eine ihrer Funktionen scheint darin zu bestehen, dass sie den Oxydationsvorgang des Tierkörpers beeinflussen. Das Verhalten des respiratorischen Gaswechsels nach Kastration war schon vielfach Gegenstand eifriger und eingehender Untersuchungen, und es wurde eine Reihe interessanter Versuche darüber veröffentlicht. Nach Loewy u. Richter kam keine Veränderung unmittelbar nach der Kastration zustande, bei Hündinnen trat erst nach vielen (10–15) Wochen eine dauernde Verringerung des Sauerstoffverbrauchs ein. Oophorindarreichung hob den respiratorischen Gaswechsel erheblich über den Ausgangswert hinaus. Zu prinzipiell gleichen Resultaten wie Loewy u. Richter kamen Eckstein u. Grafe, Heymans, Tsubura, Biedl, Grafe, Fächtners u. a., während in den Untersuchungen von Korentschewsky und seinen Schülern Rowinsky u. Schneider die Resultate ziemlich starke Schwankungen zeigten, ja manchmal sogar Steigerungen auftraten; auch in Shebuneffs Versuchen bei männlichen Hunden und Kaninchen wurde nicht immer ein Absinken beobachtet. Im Gegensatz zu diesen Befunden von

Loewy u. Richter usw. standen die Resultate der Versuche von Lüthje, Bertsch, Plaut u.a., Lüthje leugnete beim Hund jeden Einfluss der Kastration sowohl auf Körpergewicht wie auf Gasstoffwechsel.

Denselben wechselnden Einfluss des Ausfalls der Keimdrüsenfunktion auf den Gesamtstoffwechsel wie bei Tieren sieht man auch beim Menschen. Zuntz stellte an vier kastrierten Frauen zunächst Abwesenheit von Veränderungen nach der Kastration fest, aber bei weiteren Untersuchungen trat eine ausgeprägte Herabsetzung des respiratorischen Stoffwechsels längere Zeit nach der Kastration hervor. Bei zwei Eunuchoiden liess sich eine solche Herabsetzung gegenüber gleichgrossen normalen Individuen nicht nachweisen. Durch Oophorin gelang es weder bei diesen noch bei Kastrierten eine Steigerung des respiratorischen Stoffwechsels zu erzielen. Bei Entfernung oder Unterfunktion des Hodens oder des Ovariums bemerkten Lipschütz, Tierney, Liebenson, Loewy u. Kaminer, Fischer u.a. einen herabgesetzten Gaswechselwert, dagegen in anderen Fällen beobachteten Löffler, Plaut u.a. ganz normale Werte des Gaswechsels.

Bezüglich des Einflusses der Darreichung von Keimdrüsenpräparaten auf den respiratorischen Gaswechsel gehen die Resultate der Versuche vieler Autoren auch ziemlich auseinander. Nach der Anschauung von Loewy u. Richter, Weil, Biedl u.a. bleibt die Darreichung der Hoden- bzw. Ovarialsubstanz ohne Wirkung auf den Gaswechsel der gesunden normalen Tiere, dagegen zeigten Yasuda und Veer die gaswechselsteigernde Wirkung der Keimdrüsenpräparate. Andererseits fanden Loewy u. Richter, Biedl, Yasuda u.a. eine Steigerung des nach der Kastration herabgesetzten Gaswechsels durch Verabreichung von Keimdrüsenpräparaten, während Korentschewsky, Bertsch, Tsubura u.a. keine Steigerung des Gaswechsels erzielen konnten. Auch die Angaben in den klinischen Beobachtungen über das Verhalten des Gaswechsels nach Darreichung von Keimdrüsenpräparaten bei der Entfernung oder der Unterfunktion der Keimdrüsen lauten widersprechend (Zuntz, Loewy u. Kaminer, Brugsch u. Rothmann u.a.).

Neuerdings stellte Yasuda eine Untersuchung über die Indophenoloxidasereaktion der Gewebe bei kastrierten Kaninchen an und fand eine Herabsetzung dieser Reaktion durch die Kastration. Tsubura bemerkte in seiner eingehenden Untersuchung, dass eine Verminderung des respiratorischen Gawechsels nach der Kastration eintrat, und dass dieser verminderte Gaswechsel durch Transplantation von Keimdrüsen mehr oder weniger gehoben wurde, während die Verfütterung von Keimdrüsensubstanz ohne Wirkung blieb. Nach Kamei u. Sasaki ist kein merkbarer Einfluss auf den Glutathiongehalt nach der Hodenexstirpation zu erkennen, während bei der Ovariumentfernung sich eine geringe Neigung zur Vermehrung des Glutathions in den meisten Organen zeigt. Die Verabreichung von Hodenpulver führt zu Glutathionverminderung in den meisten Organen.

Über die Wirkung der Keimdrüsen auf den respiratorischen Gaswechsel sind also zahlreiche eingehende experimentelle Untersuchungen, Verfütterungsversuche bei Tieren, sowie klinische Beobachtungen beim Menschen angestellt worden; leider bestehen aber grosse Meinungsverschiedenheiten unter den Autoren, auch scheinen die bisherigen Versuchsanordnungen etwas ungenügend, um sichere Schlüsse daraus ziehen zu können. Ferner gibt es soweit die Literatur mir zugänglich ist, fast keine Forschungen über die Beziehung zwischen dem Reduktionsvermögen des Gewebes und der Wirkung der Keimdrüsen. Besonders im Brennpunkt meines Interesses steht die Frage, ob die bei der Entwicklung der sekundären Geschlechtscharaktere sich bei den beiden Geschlechtern ganz verschieden gestaltenden Hoden und Ovarien ganz dieselbe Funktion in bezug auf den respiratorischen Stoffwechsel besitzen oder nicht. Auch besitzen bekanntlich die Ovarien drei Arten Hormone, nämlich das Hormon vom Stroma, das vom Corpus Luteum, sowie das vom Liquor Folliculi, weshalb die Hormone der Ovarien auffallend komplizierter als die der Hoden sind.

Um die so divergenten Resultate der diesbezüglichen Untersuchungen des Gaswechsels unter Berücksichtigung der geschlechtlichen Unterschiede zu kontrollieren und zu einem sicheren Schluss zu gelangen, studierte ich die Wirkung der Keimdrüsen auf das

Oxydations- und Reduktionsvermögen und führte zu diesem Zweck Kastrations- sowie Transplantationsversuche aus.

VERSUCHSMETHODIK.

Als Versuchstiere wurden Kaninchen gebraucht. Zur Untersuchung des Oxydationsvermögens wurde das Blut aus den Ohrvenen verwendet, zu der des Reduktionsvermögens der *M. gastrocnemius*. Das Oxydationsvermögen des Blutes wurde bei demselben Tier vor der Kastration oder Transplantation sowie 10, 20, 40 und 60 Tage nach der Operation untersucht. Am 20., 40. und 65. Tage nach der Kastration oder Transplantation wurde das Tier getötet, und sofort der *M. gastrocnemius* herausgeschnitten; dann wurde das Reduktionsvermögen bestimmt. Der Hoden oder das Ovarium als Transplantat wurde ganz frisch und streng aseptisch aus gesundem Kaninchen herausgenommen, woraufhin sofort die subcutane Transplantation auf die äussere Fläche der Bauchmuskeln des zugleich frisch kastrierten Kaninchens von gegenseitigem Geschlecht ausgeführt wurde, um das weitere Schicksal des Transplantats leicht durch äussere Betrachtung und Betastung verfolgen zu können.

Echte langdauernde Transplantation des Hodens zu erzielen ist bekanntlich äusserst schwer. Bei meinen Fällen war der makroskopisch gut angewachsene transplantierte Hoden bis zum 40sten Tage nach der Operation zu erkennen, aber am etwa 65sten Tage scheint der Hoden meist nekrotisch zu werden, während bei der Transplantation des Ovariums wenigstens im Laufe von 65 Tagen das makroskopisch gut angewachsene Ovarium in den meisten Fällen nachgewiesen wurde. Zur Bestimmung des Oxydations- und Reduktionsvermögens wurden das von Vernon angegebene, später von Staemmler-Sanders etwas modifizierte Verfahren und das in meinen früheren Mitteilungen ausführlich beschriebene Verfahren von Ahlgren benutzt. Demzufolge entspricht beim Oxydationsvermögen die grössere Zahl in den Tabellen einem stärkeren Oxydationsvermögen, während beim Reduktionsvermögen das Verhältnis umgekehrt ist.

VERSUCHSERGEBNISSE.

A. Oxydationsvermögen des Blutes.

1. Gesunde Kaninchen.

Vor den eigentlichen Versuchen habe ich das Oxydoreduktionsvermögen der gesunden Kaninchen gemessen. Die Resultate sind in Tabelle I und IV zusammengefasst. Im Durchschnitt von allen 50 Fällen war die Indophenoloxidasereaktion beim männlichen Kaninchen stärker als beim weiblichen.

2. Kastrierte Kaninchen.

Nach der Kastration der männlichen Kaninchen kommt eine Herabsetzung der Indophenoloxidasereaktion zustande, und zwar

TABELLE I. Gesunde Kaninchen.

Männliche Kaninchen		Weibliche Kaninchen	
Körpergew. (g)	Oxydations- vermögen	Körpergew. (g)	Oxydations- vermögen
2200	2.4	2400	1.9
1880	2.8	2200	2.5
2000	3.2	2000	1.6
1950	2.5	2400	2.4
2000	2.8	2100	2.4
2200	3.1	2400	2.6
1900	2.9	2100	2.4
1950	2.8	2150	2.1
2200	3.3	2000	2.8
1900	2.5	2100	1.9
2100	3.1	2300	2.2
1950	2.9	2000	1.9
2100	2.8	2200	2.6
2150	2.3	1900	2.4
2100	2.9	2100	2.3
1950	3.0	1950	2.4
1850	3.0	2200	2.5
2400	3.1	2250	2.4
2300	2.3	2000	2.7
2400	3.0	2150	2.2
2100	2.2	2100	2.4
2200	2.6	2150	2.6
1760	2.2	2150	2.4
2000	2.5	2000	2.3
2000	2.7	1800	2.4
2061	2.8 ± 0.04	2124	2.3 ± 0.04

TABELLE II. Kastrationsversuche.

(a) Männliche Kaninchen.

Vor der Operation		Am 10. Tage nach der Operation		Am 20. Tage nach der Operation		Am 40. Tage nach der Operation		Am 60. Tage nach der Operation	
Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen
2200	2.4	2000	2.6	2150	2.4	2150	1.8	1940	2.0
1880	2.3	1700	2.7	1750	2.4	1800	1.8	1750	2.2
1950	2.9	1850	2.6	2000	2.7	1950	2.0	2300	2.4
1950	2.9	2000	2.8	2000	2.2	2050	2.7	2300	2.6
2150	2.3	2100	2.1	—	—	1900	2.3	1800	2.3
2100	2.9	1900	1.9	—	—	—	—	—	—
2100	2.8	2000	1.9	—	—	—	—	—	—
2047	2.7±0.06	1936	2.4±0.09	1975	2.4±0.07	1970	2.1±0.12	2018	2.3±0.07

(b) Weibliche Kaninchen.

Vor der Operation		Am 10. Tage nach der Operation		Am 20. Tage nach der Operation		Am 40. Tage nach der Operation		Am 60. Tage nach der Operation	
Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen
2100	2.5	1850	2.5	2000	2.5	2150	2.6	2250	2.3
2150	2.1	2000	1.8	2050	2.2	2050	2.3	1750	2.6
2100	2.3	2050	2.2	2050	2.3	2100	2.3	2250	2.4
2000	2.8	—	—	2250	2.9	1950	2.8	1900	2.5
1950	2.3	—	—	2250	2.7	1850	2.7	1900	2.3
2060	2.4±0.08	1966	2.2±0.14	2120	2.5±0.09	2020	2.5±0.07	2010	2.4±0.04

TABELLE III. Transplantationsversuche.

(a) Feminisierte männliche Kaninchen.

Vor der Operation		Am 10. Tage nach der Operation		Am 20. Tage nach der Operation		Am 40. Tage nach der Operation		Am 60. Tage nach der Operation	
Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen
1900	2.5	1800	2.0	1800	2.0	1900	2.3	1900	2.4
2000	2.7	1900	2.6	1900	2.4	1950	2.2	2050	2.0
1900	2.9	1800	2.4	1850	2.3	1950	2.1	1850	2.5
1950	2.7	1800	2.7	1850	2.7	1900	2.2	1750	2.1
2100	3.1	2000	2.6	2130	2.2	2500	2.4	2200	2.2
1970	2.8±0.07	1860	2.5±0.09	1906	2.3±0.08	2040	2.2±0.04	1950	2.2±0.06

(b) Maskulierte weibliche Kaninchen.

Vor der Operation		Am 10. Tage nach der Operation		Am 20. Tage nach der Operation		Am 40. Tage nach der Operation		Am 60. Tage nach der Operation	
Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen	Körper-gew. (g)	Oxydations-vermögen
2100	2.5	1950	2.5	2000	2.5	2000	2.7	2100	2.6
2000	2.0	1900	2.0	1950	2.3	2000	2.1	2100	2.1
1900	2.5	1700	2.4	1800	2.6	1800	2.7	1700	2.8
2250	2.5	—	—	2230	2.4	1900	2.8	2900	2.7
2150	2.7	—	—	2080	2.3	1950	2.8	2000	2.9
2080	2.4±0.08	1830	2.3±0.10	2012	2.5±0.06	1930	2.6±0.09	1960	2.6±0.09

ist der Herabsetzungsgrad etwa am 40sten Tage nach der Kastration am deutlichsten. Die Ovariectomie scheint fast keinen Einfluss auf die Indophenoloxidasereaktion der weiblichen Kaninchen auszuüben, und zwar ist am 60sten Tage nach der Operation diese Reaktion beim kastrierten Weibchen fast so stark wie beim kastrierten Männchen.

3. *Feminierte oder maskulierte Kaninchen.*

Bei dem feminierten männlichen Kaninchen zeigt sich nach der Operation eine allmähliche Herabsetzung der Indophenoloxidasereaktion, und zwar scheint der Herabsetzungsgrad hier deutlicher als beim nur orcheotomierten Kaninchen zu sein. Beim maskulierten weiblichen Kaninchen scheint eine ganz leichtgradige, allmähliche Verstärkung dieser Reaktion nach der Operation erkennbar zu sein.

B. *Reduktionsvermögen des M. gastrocnemius.*

1. *Gesunde Kaninchen.*

Wie in Tabelle IV ersichtlich, ist beim weiblichen Kaninchen die Methylenblauentfärbungsreaktion stärker als beim männlichen.

2. *Kastrierte Kaninchen.*

Die Kastration der männlichen Kaninchen scheint eine ganz leichtgradige Verstärkung der Methylenblauentfärbungsreaktion zur Folge zu haben. Nach der Kastration der weiblichen Kaninchen wird eine allmähliche Herabsetzung dieser Reaktion nachgewiesen, und am 65sten Tage nach der Operation ist sie beim kastrierten Weibchen fast so stark wie beim kastrierten Männchen.

3. *Feminierte oder maskulierte Kaninchen.*

Beim feminierten männlichen Kaninchen tritt eine allmähliche Verstärkung der Methylenblauentfärbungsreaktion nach der Operation ein, und zwar scheint der Verstärkungsgrad deutlicher als beim nur orcheotomierten Kaninchen zu sein. Beim maskulierten weiblichen Kaninchen wird eine Herabsetzung dieser Reak-

tion nachgewiesen. Sowohl die Kastration als auch die Transplantation ruft eine geringe Verminderung des Körpergewichts nach der Operation hervor.

Fasst man die Resultate der obigen Versuche zusammen, so kann man folgendes sagen:

1. Das Oxydationsvermögen beim männlichen Kaninchen ist stärker als beim weiblichen, während das Reduktionsvermögen sich umgekehrt verhält.

2. Beim kastrierten männlichen Kaninchen zeigt das Oxydationsvermögen eine Herabsetzung, während das Reduktionsvermögen eine geringe Neigung zur Verstärkung aufweist. Das Oxydationsvermögen der kastrierten weiblichen Kaninchen bleibt fast unbeeinflusst, während das Reduktionsvermögen eine He-

TABELLE IV. Gesunde Kaninchen.

{ M. = Minuten
S. = Sekunden

Männliche Kaninchen		Weibliche Kaninchen	
Körpergew. (g)	Reduktions- vermögen	Körpergew. (g)	Reduktions- vermögen
	M.S.		M.S.
2100	2.43	2200	2.43
2050	3.35	2200	2.38
1850	3.07	2000	2.21
2100	3.23	2200	2.28
1920	3.20	2200	3.09
2000	2.30	1950	3.04
2050	3.07	2050	2.31
2100	3.11	2150	2.27
1950	3.03	2100	2.33
2050	2.46	2000	2.30
1900	2.59	1800	2.26
1850	3.15	2000	2.20
2000	3.26	1950	2.15
2150	3.36	2000	2.36
2030	2.38	1970	2.57
2006	3.07 ± 0.04	2051	2.36 ± 0.03

TABELLE V. Kastrationsversuche.

(a) Am 20. Tage nach der Operation.

Männliche Kaninchen		Weibliche Kaninchen	
Körpergew. (g)	Reduktions- vermögen	Körpergew. (g)	Reduktions- vermögen
	M.S.		M.S.
1900	3.11	1850	2.54
1950	3.05	1850	2.36
2000	3.03	2050	2.48
1850	3.18	2000	3.05
2000	2.55	2150	2.49
1940	3.06±0.03	1980	2.50±0.03

(b) Am 40. Tage nach der Operation.

Männliche Kaninchen		Weibliche Kaninchen	
Körpergew. (g)	Reduktions- vermögen	Körpergew. (g)	Reduktions- vermögen
	M.S.		M.S.
1800	3.05	1950	2.40
1800	3.04	2050	2.55
1950	2.53	2150	2.58
1950	2.51	1900	2.50
2000	2.58	1850	3.06
1900	2.58±0.02	1980	2.54±0.03

(c) Am 65. Tage nach der Operation.

Männliche Kaninchen		Weibliche Kaninchen	
Körpergew. (g)	Reduktions- vermögen	Körpergew. (g)	Reduktions- vermögen
	M.S.		M.S.
1750	3.04	2150	2.37
2300	2.47	1850	3.07
1850	3.19	1850	2.57
2050	2.54	2250	2.57
1940	2.59	1930	3.03
2000	2.47		
1981	2.58±0.03	2006	2.56±0.03

TABELLE VI. Transplantationsversuche.

(a) Am 20. Tage nach der Operation.

Feminierte männliche Kaninchen		Maskulierte weibliche Kaninchen	
Körpergew. (g)	Reduktionsvermögen	Körpergew. (g)	Reduktionsvermögen
	M.S.		M.S.
1900	3.04	1870	2.58
1950	3.05	2000	2.37
1850	3.12	1900	3.01
1850	2.59	1970	3.09
1930	2.47		
1896	3.01±0.03	1935	2.56±0.05

(b) Am 40. Tage nach der Operation.

Feminierte männliche Kaninchen		Maskulierte weibliche Kaninchen	
Körpergew. (g)	Reduktionsvermögen	Körpergew. (g)	Reduktionsvermögen
	M.S.		M.S.
1950	2.50	2060	2.36
1850	2.41	1850	2.55
1840	3.06	1840	3.03
1840	3.01	2010	2.47
2100	3.03		
1916	2.56±0.03	1940	2.50±0.04

(c) Am 65. Tage nach der Operation.

Feminierte männliche Kaninchen		Maskulierte weibliche Kaninchen	
Körpergew. (g)	Reduktionsvermögen	Körpergew. (g)	Reduktionsvermögen
	M.S.		M.S.
1950	2.52	2100	2.45
1850	2.43	1900	3.02
2050	2.42	2100	3.04
2200	3.06	1950	2.54
2050	2.44	1790	3.11
2020	2.49±0.03	1968	2.59±0.03

rabsetzung erfährt.

3. Bei feminierten männlichen Kaninchen bemerkt man eine ziemlich auffallende Herabsetzung des Oxydationsvermögens und eine leichte Verstärkung des Reduktionsvermögens. Bei maskulieren weiblichen Kaninchen zeigt das Oxydationsvermögen eine leichte Verstärkung, das Reduktionsvermögen hingegen eine ziemlich starke Herabsetzung.

4. Aus diesen Resultaten darf man vermuten, dass der Hoden hauptsächlich zum Oxydationsvorgang in enger Beziehung steht, das Ovarium dagegen hauptsächlich zum Reduktionsvorgang.

DISKUSSION.

Bekanntlich stellen Oxydation und Reduktion einen Grundvorgang zahlreicher Lebenserscheinungen dar und spielen als Energiespender eine ausserordentlich wichtige Rolle im Haushalt der lebenden Organismen. Daher sind diese Vorgänge seit langer Zeit Gegenstand eifrigster Forschung der Biologen gewesen. Leider findet man Untersuchungen über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydoreduktionsvermögens nicht so häufig, und wie ich schon in der ersten Mitteilung dieser Abhandlung angegeben habe, gibt es nur einige wenige Forschungen von Tadokoro, Joyet-Lavergne, Mühl u.a.. Neuerdings (1931) hat Rey auch das Redoxpotential bei *Gregarina polymorpha*, *Gregarina cuneata* und *Steinina ovalis* bestimmt und konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen von Joyet-Lavergne keine Unterschiede im Redoxpotential zwischen beiden Geschlechtern beobachten. Ferner bemerkten in bezug auf das Glutathion, welches bei der Oxydoreduktion eine Rolle spielt, Kitamura, Dohi u. Asano die Überlegenheit an Glutathiongehalt des Männerblutes im Vergleich mit dem Frauenblut.

Ich habe meinerseits die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und Reduktionsvermögens unter Anwendung der Vernonschen, Ahlgrensen, Warburgschen, Gierkeschen, sowie Kodamaschen Methode studiert und bin zu folgenden Resultaten gelangt: Beim männlichen Tier (Kaninchen, Meer-schweinchen, Ratte und Katze) ist die Indophenoloxidasereaktion

stärker als beim weiblichen, während die Methylenblauentfärbungsreaktion sich umgekehrt verhält. Beim jungen Kaninchen bemerkt man auch in bezug auf diese Reaktionen die gleichen geschlechtlichen Unterschiede. Beim männlichen Kaninchen ist die Menge bzw. die Zahl der Oxydasegranula im Muskelfaserquerschnitt grösser als beim weiblichen. Der Sauerstoffverbrauch der Skelettmuskulatur erweist sich beim männlichen Kaninchen grösser als beim weiblichen. Beim männlichen Tier (Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Katze) ist das Oxydationspotential in den Geweben grösser als beim weiblichen. Das Reduktionspotential erweist sich beim weiblichen Tier grösser als beim männlichen. Die geschlechtlichen Unterschiede der Indophenoloxidasereaktion scheinen am etwa 13ten Bruttage des Hühnerembryos sichtbar zu werden; die Indophenoloxidasereaktion beim männlichen Hühnerembryo wird dann nämlich stärker als beim weiblichen. Die geschlechtlichen Unterschiede der Methylenblauentfärbungsreaktion scheinen am etwa 12ten Bruttage aufzutreten, d.h. diese Reaktion erweist sich beim weiblichen Hühnerembryo in dieser Periode stärker als beim männlichen.

Aus diesen sowie den unter Anwendung der Stämmeler-Sandersschen sowie Ahlgrenschen Methode gewonnenen Ergebnissen glaube ich folgern zu können, dass das Oxydationsvermögen in den Geweben beim männlichen Tier stärker als beim weiblichen ist, während das Reduktionsvermögen sich umgekehrt verhält.

SCHLÜSSE.

Meine sämtlichen fünf bisherigen Mitteilungen zusammenfassend, komme ich zu folgenden Schlüssen:

1. Beim männlichen Tier ist das Oxydationsvermögen stärker als beim weiblichen.
2. Das Reduktionsvermögen beim weiblichen Tier erweist sich stärker als beim männlichen.
3. Sowohl beim erwachsenen und jungen Tier als auch schon beim Embryo kann man diese geschlechtlichen Unterschiede bemerken.

4. Die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydoreduktionsvermögens beruhen vermutlich auf der Funktion der Keimdrüsen.

LITERATUR.

- Bertschi (1920): *Biochem. Zeitschr.*, **106**, 37.
 Biedl (1913): *Innere Sekretion*, 2. Teil, Berlin.
 Dohi u. Asano (1932): *Nihon Naikwa Gakkwai Zassi*, **19**, 1325.
 Eckstein u. Grafe (1919): *Hoppe-Seylers Zeitschr.*, **107**, 73.
 Fischer (1927): *Klin. Wochenschr.*, **6**, 2239.
 Grafe (1923): *Ergeb. Physiol.*, **21**, 265.
 Heymans (1922): *Endocrinology*, **6**, 546.
 Joyet-Lavergne (1926): *Cpt. r. Soc. Biol.*, **94**, 1113.
 „ (1931): *Ebenda*, **107**, 951.
 „ (1931): *La physico-chimie de la sexualité*, Berlin.
 Kagiyaama (1932): *Nagasaki Igakkwai Zassi*, **10**, 404.
 „ (1932): *Ebenda*, **10**, 1261.
 „ (1932): *Journ. Biochem.*, **15**, 99.
 „ (1933): *Ebenda*, **17**, 135.
 Kamei u. Sasaki (1929): *Folia endocrinol. Japon*, **5**, 1308.
 Kitamura (1929): *Kyoto Ikwa Daigaku Zassi*, **3**, 159.
 Korentschewsky (1925): *zit. nach Ronas Berichten*, **31**, 242.
 Liebensny (1924): *Biochem. Zeitschr.*, **144**, 308.
 Lipschütz (1919): *Die Pubertätsdrüse u. ihre Wirkungen*, Bern.
 Loewy u. Kaminer (1916): *Bl. Klinisch. Wochenschr.*, **61**, 1123.
 Loewy u. Richter (1899): *Arch. Anat. u. Physiol., Suppl. Bd.*, **174**.
 Löffler (1919): *Zeitschr. f. kl. Med.*, **87**, 280.
 Luthje (1902): *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol.*, **48**, 184.
 „ (1903): *Ebenda*, **50**, 268.
 Pächtner: *zit. nach Biedl (1913)*.
 Plaut (1923): *Deutsch. Arch. f. kl. Med.*, **142**, 266.
 „ (1924): *Klin. Wochenschr.*, **3**, 1664.
 Rey (1931): *Cpt. r. Soc. Biol.*, **107**, 611.
 „ (1931): *Ebenda*, **107**, 1508.
 Shebuneff: *zit. nach Grafe (1923)*.
 Staemmler-Sanders (1925): *Virehows Arch.*, **256**, 595.
 Tierney: *zit. nach Grafe (1923)*.
 Tsubura (1925): *Biochem. Zeitschr.*, **143**, 291.
 Veer (1924): *Zeitschr. f. d. g. exp. Med.*, **44**, 240.
 Weil (1920): *Pflügers Arch.*, **185**, 33.
 Yasuda (1927): *Folia endocrinol. Japon.*, **3**, 1454.
 „ (1929): *Ebenda*, **5**, 1165.
 Zuntz (1904): *Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gyn.*, **53**, 352.
 „ (1904): *Zentrallbl. f. Gyn.*, **48**, 1492.
 „ (1912): *Arch. f. Gyn.*, **96**, 188.

STUDIEN ÜBER DIE GEWEBSATMUNG UND DIE INDOPHENOLOXYDASEREAKTION DER SERÖSEN MEMBRANEN.

VON

K. KIYOHARA UND S. KAGIYAMA.

*(Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät zu Nagasaki.
Direktor: Prof. Dr. D. Ogata.)*

(Eingegangen am 8. August 1933)

Zur Beobachtung des Oxydationsvermögens in den Geweben sind bisher mehrere Methoden benutzt worden; vor allem wurde die Bestimmungsmethode des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlensäureabgabe seit sehr langer Zeit angewandt. Besonders seitdem Warburg (1923) eine ausgezeichnete Bestimmungsmethode der Gewebsatmung erdacht hat, wurden zahlreiche Untersuchungen mittels seiner Methode ausgeführt und veröffentlicht. Die histologische Methode der Indophenoloxidasereaktion, die von Schultze (1909), Gierke (1911) u.a. verbessert wurde, wurde auch in mehreren Arbeiten verwendet und ist wegen der Einfachheit der Technik und der Wichtigkeit der Beobachtung der Oxydation als eine ausgezeichnete Beobachtungsmethode anzusehen.

Die Studien über die Physiologie der serösen Membranen behandeln hauptsächlich die Beziehung der eigentlichen Membranzellen zu den an der Bildung dieser Membranen beteiligten Bindegewebszellen und zu den in dem von diesen Membranen eingeschlossenen Körperraum freiliegenden oder im Exsudat befindlichen Zellen einerseits, und das Resorptionsvermögen, die Sekretion sowie die Übertragung der Stoffe anderseits; aber das Studium des Stoffwechsels dieser Membranen selbst ist fast ohne Berücksichtigung geblieben. Davon ausgehend haben die Verfasser die Gewebsatmung sowie die Indophenoloxidasereaktion der serösen Membranen unter Anwendung der Warburgschen (1923) und Gierkeschen (1911) Methoden untersucht und weiter die Beziehung zwischen dem Sauerstoffverbrauch und dem Gehalt an

Oxydasegranulae beobachtet.

Die aus makroskopisch fettarmen und möglichst denselben Teilen der Membranen entstammenden Materialien konnten ohne weiteres verwendet werden, weil die Dicke der Membranen weit geringer als die Grenzschnittdicke nach Warburg war. Bei der Messung des Sauerstoffverbrauchs wurden diese Materialien an den Glasnadeln der Atmungskölbchen aufgespannt, und bei der Beobachtung der Oxydasereaktion wurden sie nach Färbung auf die Objektgläser sorgfältig aufgespannt und mit Glycerin verschlossen.

RESULTAT.

Beim Hund war der Sauerstoffverbrauch des Mediastinums am grössten und betrug 1,4 cmm pro Stunde und Milligramm (Trockengewicht), beim Omentum etwa gleich wie beim Mediastinum (1,3 cmm), beim Mesenterium merklich geringer als bei den beiden vorigen (1,0 cmm), beim Perikardium noch weit geringer (0,6 cmm) und bei der Pleura 0,4 cmm (Tabelle I). Beim Peritoneum betrug der durchschnittliche Wert in sämtlichen Fällen 0,1 cmm, doch in einigen Fällen kam eine Druckänderung

TABELLE I. $\frac{\text{cmm O}_2}{\text{mg Std.}}$ (Hund)

Körper- gew. (kg)	Geschl.	Oment.	Mesent.	Mediast.	Perik.	Pleura	Perit.
10,8	♀	1,2	0,9	1,3	0,6	0,5	0,2
5,0	♂	0,7	0,8	0,9	0,4	0,2	0,0
6,4	♂	1,5	1,0	0,9	0,6	0,4	0,1
5,4	♀	1,7	1,3	1,7	1,6	0,7	0,1
4,5	♀	1,6	1,1	1,5	0,4	0,3	0,2
4,2	♂	0,9	0,9	1,6	0,9	0,6	0,0
6,2	♀	1,6	0,7	1,2	0,5	0,5	0,0
9,6	♂	0,8	1,4	1,5	0,4	0,2	0,3
4,5	♀	1,1	0,6	1,8	0,8	0,2	0,0
4,3	♀	1,7	1,2	1,6	0,7	0,3	0,1
Mittel		1,3	1,0	1,4	0,6	0,4	0,1

des Manometers gar nicht zum Vorschein, also konnte in solchen Fällen kein Sauerstoffverbrauch beobachtet werden (Tabelle I).

Beim Kaninchen verhielt sich die Reihenfolge etwas verschieden; nämlich der Sauerstoffverbrauch des Omentums war ausnehmend gross und betrug 2,6 cmm, der des Perikardiums 1,0 cmm, der des Mesenteriums 0,7 cmm, der des Mediastinums 0,4 cmm, der der Pleura 0,3 cmm; der des Peritoneums war am geringsten und betrug 0,2 cmm (Tabelle II).

TABELLE II. $\frac{\text{cmm O}_2}{\text{mg Std.}}$ (Kaninchen)

Körper- gew. (kg)	Geschl.	Oment.	Mesent.	Mediast.	Perik.	Pleura	Perit.
2,5	♀	2,1	1,3	0,3	0,7	0,3	0,2
1,8	♀	3,3	0,8	0,4	0,5	0,1	0,3
2,3	♀	3,0	0,5	0,2	1,9	0,3	0,0
2,1	♀	2,0	0,9	0,5	1,1	0,5	0,0
2,0	♀	2,9	1,2	0,2	0,8	0,2	0,2
2,3	♂	2,4	0,8	0,7	0,7	0,3	0,1
2,2	♀	1,6	0,6	0,4	0,8	0,2	0,2
2,0	♀	3,2	0,4	0,4	1,5	0,1	0,3
2,5	♂	2,0	0,4	0,5	0,3	0,5	0,1
2,1	♂	3,4	0,8	0,4	1,0	0,4	0,3
Mittel		2,6	0,7	0,4	1,0	0,3	0,2

Aus zahlreichen Versuchen konnten die obenbeschriebenen Resultate bestätigt werden, doch wurden bei den serösen Membranen sehr grosse Schwankungen bemerkt, die bei vielen anderen Geweben nicht beobachtet wurden. Nach unserer Anschauung scheint die Hauptursache dieser grossen Schwankungen das Fett zu sein, welches an den Membranen haftet. Das Fett übt einen merklichen Einfluss auf das Gewicht des Gewebes aus, und zwar wegen seiner leichtgradigen Gewichtsabnahme im Vergleich mit vielen anderen Geweben bei Austrocknung bei 100°C. Also werden die Werte des Sauerstoffverbrauchs auffallend geringer als die echten. Wenn die Materialien bei den Untersuchungen auch aus möglichst fettarmen Teilen der Membranen

gewonnen werden, so scheint das Fett doch ziemlich starken Einfluss auf das Gewicht auszuüben. Die Verfasser haben also den Fettgehalt der makroskopisch möglichst fettarmen Teile der Membranen beim Kaninchen wie bei der Messung der Gewebsatmung quantitativ analysiert und kamen zu folgenden Resultaten: Der Fettgehalt des Mediastinums war etwa 27%, der Pleura 24%, des Perikardiums 14%, des Omentums 9,5%, des Mesenteriums 4,5% und des Peritoneums 2% (Tabelle III).

TABELLE III. Fettgehalt(%)

Körper- gew. (kg)	Geschl.	Oment.	Mesent.	Mediast.	Perik.	Pleura	Perit.
2,4	♀	12	3	19	19	28	1
1,9	♂	7	5,5	35	10	20	2
2,2	♀	9,5	5	26	13	24	3
Mittel		9,5	4,5	27	14	24	2

Nach der Berechnung des Sauerstoffverbrauchs auf das Trockengewicht, wobei durch Alkohol und Äther vor der Austrocknung das Fett beseitigt worden war, betrugen der Sauerstoffverbrauch des Omentums beim Hund 3,5 cmm, des Mediastinums 2,9 cmm, des Mesenteriums 1,2 cmm, der Pleura 1,0 cmm, des Perikardiums 0,9 cmm und des Peritoneums 0,1 cmm, während beim Kaninchen der des Omentums 4,9 cmm, des Perikardiums 2,8 cmm, des Mediastinums 2,3 cmm, des Mesenteriums 1,2 cmm, der Pleura 0,3 cmm und des Peritoneums 0,3 cmm betrug (Tabelle IV). Bei diesen Versuchen zeigt sich das Gewicht der Membranen etwas leichter als das echte, also erweisen sich auch die Werte des Sauerstoffverbrauchs etwas grösser als die echten.

Wenn der Sauerstoffverbrauch der Membranen auch wegen der Verschiedenheiten des Fettgehaltes nicht ganz sicher festzustellen ist, so kann doch aus den obenerwähnten Resultaten als zuverlässig vermutet werden, dass beim Hund der Sauerstoffverbrauch des Mediastinums und des Omentums am grössten ist, der des Mesenteriums, des Perikardiums und der Pleura mittelgross und der des Peritoneums am geringsten, während beim Kaninchen

TABELLE IV. $\frac{\text{cmm O}_2}{\text{mg Std.}}$

(Hund)

Körper- gew. (kg)	Geschl.	Oment.	Mesent.	Mediast.	Perik.	Pleura	Perit.
2,1	♀	2,7	0,9	2,7	0,8	0,9	0,2
3,0	♀	2,9	0,7	3,8	0,5	1,0	0,0
1,8	♂	4,2	1,5	2,8	1,3	1,2	0,1
2,1	♀	—	0,9	3,1	1,0	—	0,1
2,3	♂	3,8	1,4	4,1	—	0,6	0,2
2,4	♂	4,1	1,3	2,4	0,7	0,8	0,0
2,3	♀	3,8	1,1	—	0,9	1,4	0,0
2,0	♂	—	1,9	2,0	1,0	1,1	—
2,2	♂	3,0	—	2,1	1,1	1,1	0,1
Mittel		3,5	1,2	2,9	0,9	1,0	0,1

(Kaninchen)

Körper- gew. (kg)	Geschl.	Oment.	Mesent.	Mediast.	Perik.	Pleura	Perit.
2,1	♂	5,2	0,9	2,4	2,9	—	0,4
2,0	♀	3,6	1,3	2,0	2,3	0,2	0,3
1,9	♀	4,1	1,7	3,0	3,5	0,5	0,0
2,4	♂	5,4	—	1,9	2,1	0,3	0,5
2,6	♀	—	1,4	2,0	—	0,1	0,4
2,1	♀	6,1	0,8	—	3,3	0,4	0,4
2,3	♂	—	1,0	2,4	—	0,3	0,0
Mittel		4,9	1,2	2,3	2,8	0,3	0,3

der des Omentums und des Perikardiums am grössten, der des Mesenteriums und des Mediastinums mittelgross und der der Pleura und des Peritoneums am geringsten ist. Doch das Mediastinum ist am reichsten an Fett, und wenn der Sauerstoffverbrauch auf das entfettete Trockengewicht berechnet wird, zeigt er einen beträchtlich grossen Wert; also kann man annehmen, dass das Mediastinum eine etwa so grosse Menge Sauerstoff wie das Omentum oder das Perikardium verzehrt.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Indophenoloxidasereaktion sind aus Tabelle V zu ersehen. Nach der Grösse des Gehaltes der Oxydasegranulä können diese Membranen in der folgenden Reihe aufgestellt werden: Omentum, Mediastinum, Perikardium, Mesenterium, Pleura, Peritoneum. Diese Reihe gilt in fast allen Fällen, beim Hund wie beim Kaninchen, abgesehen von geringeren Schwankungen. Ferner besitzt jede Membran interessante Eigentümlichkeiten in der Grösse, der Färbung und der Anordnung der Granulae, d. h.

TABELLE V.

(Hund)

Körper- gew. (kg)	Geschl.	Oment.	Mesent.	Mediast.	Perik.	Pleura	Perit.
10,8	♀	+++	++	++	++	++	+
5,0	♂	+++	++	+++	++	+	+
6,4	♂	+++	++	+++	++	++	+
5,4	♀	++	++	+++	+++	++	++
4,5	♀	+++	+++	+++	+	+	—
4,2	♂	+++	++	++	++	++	++
6,2	♀	+++	++	+++	+++	++	+
9,6	♂	+++	++	+++	++	++	+
4,5	♀	+++	++	+++	++	++	+
4,3	♀	+++	+	++	++	+	+

(Kaninchen)

Körper- gew. (kg)	Geschl.	Oment.	Mesent.	Mediast.	Perik.	Pleura	Ferit.
2,5	♀	+++	+	+++	++	+	—
1,8	♀	++	++	+++	+	+	+
2,3	♀	++	+	+++	++	+	—
2,1	♀	+++	++	++	++	+	—
2,0	♀	++	+	++	++	+	+
2,3	♂	+++	++	++	++	+	+
2,2	♀	+++	++	+	+++	+	—
2,0	♀	+++	++	++	++	+	+

1. *Omentum*: Die feinen intensiv und klar gefärbten Granulae verteilen sich ganz diffus sowohl beim Kaninchen als auch beim Hund und gruppieren sich, darin verstreut, überdies in vielen rundlichen Haufen, die so zahlreich sind, dass sie dem Ganzen das Aussehen verleihen, als ob es fast nur aus diesen Granulahaufen bestehe.

2. *Mediastinum*: Sowohl beim Kaninchen als auch beim Hund bemerkt man intensiv und klar gefärbte Granulae in diffuser Anordnung, aber auch massenhaft gruppierte wie beim Omentum. Die Granulae sind sehr fein wie beim Omentum.

3. *Perikardium*: Die Granulä sowohl beim Kaninchen als auch beim Hund sind sehr fein und verteilen sich dicht und strangartig, oder entlang der dicht und fein verlaufenden Blutkapillaren, wobei sie eine schöne netzartige Figur bilden.

4. *Mesenterium*: Beim Hund verteilen sich die Granulä hauptsächlich entlang der Blutkapillaren und gruppieren sich hier und da unregelmässig zerstreut, während beim Kaninchen die Granulae schwach gefärbt sind und sich vielmehr diffus oder oft in zahlreichen Massen gruppiert verteilen.

5. *pleura*: Im allgemeinen liegen die Granulae unregelmässig und verstreut beim Kaninchen, aber spärlich an Zahl, doch oft gruppieren sie sich strangartig hier und da, während man beim Hund vielmehr diffuse und regelmässige Anordnung bemerkt, aber auch spärlich an Zahl.

6. *Peritoneum*: Wegen der schwachen Färbung zeigen sich die Granulae nicht so ausgeprägt, aber sie gruppieren sich in kleinen Haufen, oder verteilen sich entlang der Blutkapillaren, wenn auch immer sehr spärlich an Zahl. Besonders beim Kaninchen scheint die Zahl der Granulae auffallend gering zu sein.

Aus obigen Resultaten geht hervor, dass bei den Sauerstoff stark verzehrenden Membranen die Oxydasegranulä auch zahlreich sind, und dass die den Sauerstoff wenig verzehrenden Membranen auch die Oxydasegranulae spärlich enthalten; der Sauerstoffverbrauch und der Gehalt an Oxydasegranulae verhalten sich also etwa parallel zueinander, welcher Parallelismus bis heute von mehreren Autoren ohne genügende Beweise angenommen worden zu sein

scheint. Nach den Untersuchungen von Nakamura (1931) ist zu verstehen, dass der Sauerstoffverbrauch eine innige Beziehung mit der Oxydasereaktion hat, wenn auch die beiden keinen ganz untrennbaren Zusammenhang haben. Die Ergebnisse der Verfasser stimmen mit denen von Nakamura im allgemeinen überein, der Sauerstoffverbrauch und der Gehalt an Oxydasegranulae weisen nämlich tatsächlich einen Parallelismus auf, abgesehen von wenigen Ausnahmen.

LITERATUR.

- Warburg (1923): Biochem. Zeitschr., **142**, 317.
Schultze (1909): Zieglers Beitr., **45**, 125.
Gierke (1911): Münch. med. Wochenschr., 2315.
Nakamura (1931): Trans. of the Jap. pathol. Soc., **21**, 283.

Erklärung der Figuren.

- Fig. 1. Oxydasegranulae beim Omentum (Hund)
Fig. 2. Oxydasegranulae beim Mediastinum (Hund)
Fig. 3. Oxydasegranulae beim Mesenterium (Hund)
Fig. 4. Oxydasegranulae beim Perikardium (Hund)

Fig. 1.

Oxydasegranulae beim Omentum (Hund)

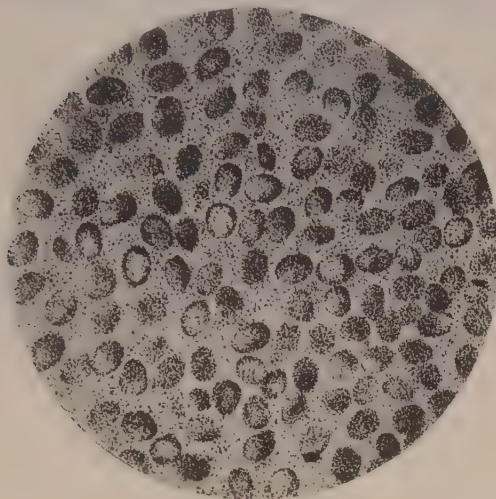


Fig. 2.

Oxydasegranulae beim Mediastinum (Hund)



Fig. 3.

Oxydasegranulae beim Mesenterium (Hund)

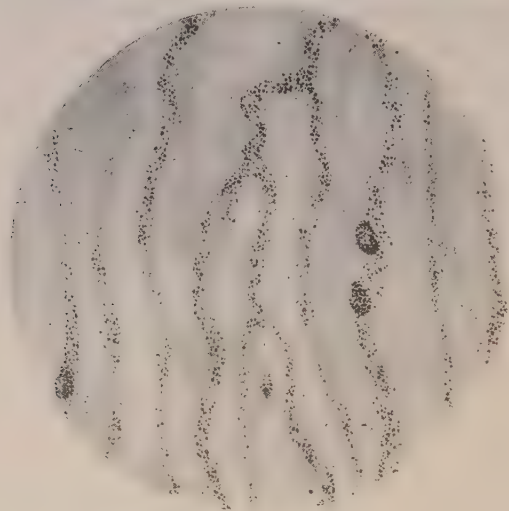
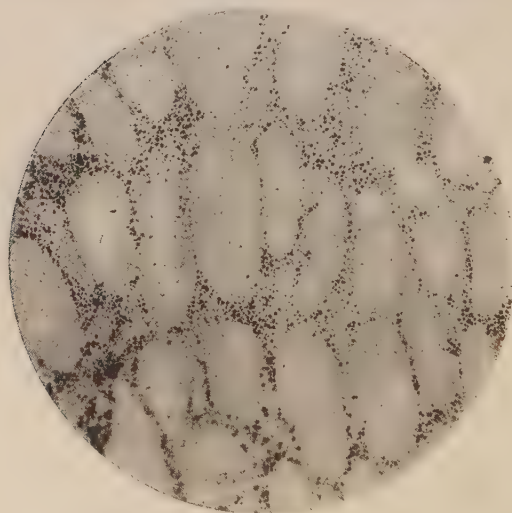


Fig. 4.

Oxydasegranulae beim Perikardium (Hund)



THE AVAILABILITY OF FRUCTOSE IN THE BODY OF NORMAL AND DIABETIC ANIMALS.

By

MINORU ABE.

(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. S. Kakiuchi.)

(Received for publication, August 9, 1933)

I. INTRODUCTION.

It has been generally believed that fructose is better utilized by the diabetic, while on the other hand the tolerance for sugar is said by some clinicians to be lowered. To decide whether or not fructose is to be recommended in the diet of a diabetic it is naturally desirable that the effect of fructose intake on the sugar metabolism of the diabetic be more thoroughly studied.

The research in this concern is to be extended in the following several directions. 1. The comparison of utility of glucose and fructose in a normal individual. 2. The utility of fructose in diabetics of different grades and the change in its utility in the course of the diabetic disease. 3. The effect of the successive intake of fructose on the process of diabetes. In the following, the results of experiments performed concerning these points are described.

II. MATERIALS AND METHOD.

Animal: As experimental animals, female dogs weighing about 10 Kilo were used. The diet consisted of rice, horse flesh, beef or fish in an amount to supply 30-40 Calories per Kilo body weight of the animal.

The animal was fed once every day between 3-4 o'clock in the afternoon.

Pancreas extirpation: To get diabetic conditions as comparable to clinical diabetic as possible, the method of F. M. Allen

(1913) was followed in the extirpation of pancreas. Caution was taken to maintain the external secretion of residual pancreas by leaving the parts lying by the accessory duct or a part of main duct. The size of the remaining pancreas was measured by comparing it to that of the excited parts. The adhesion of the remaining part was secured by covering the part with omentum. Previous to the operation the animal was fasted for a day. After the lapse of a month or two after the operation most of the animals were ready for the experiment.

Sugar: The glucose used was the anhydrous preparation supplied by Merck. The fructose used was either crystalline preparation of Merck or liquid preparation kindly supplied by the Tokyo Industrial Research Institute. The composition of the latter varied as follows.

- | | | | | | | |
|-----|-------|-----------|------|----------|-------|--------|
| I. | 75.2% | Fructose, | 2.2% | Glucose, | 22.6% | Water. |
| II. | 72.1% | „ | 0.9% | „ | 27.0% | Water. |

The contents of sugars were calculated from the values of the rotatory and reduction powers, and were expressed as anhydrous molecules.

Sugar was introduced into ventricles with a canula in 10% solution.

Urine: Urine was gathered by means of a catheter and protected by the use of toluene. The determination was performed as early as possible.

III. ANALYTICAL METHOD.

I. Nitrogen determination: Nitrogen of urine was estimated by the Kjeldahl method.

II. The reducing power of blood: The reducing power of blood was estimated by the Hagedorn-Jensen method. The error of the method remained below 2%.

The reducing power of levulose determined by the Hagedorn-Jensen method was said to correspond to 1.187 times the glucose value by G. W. Pucher and M. W. Finch. According to my research, however, the reducing power of levulose corresponds to

1.030 times the glucose value. The levulose used in my determination was Merck's reagent and was recrystallized two times from absolute alcohol in the laboratory and showed $[\alpha]_D^{20} = -91.96^\circ$.

III. *The determination of the reducing power of urine.*

a) The qualitative test of the reducing power of urine used was either that of Benedict or of Nylander.

The quantitative estimation was made by the Benedict method (1911). When the sugar concentration was low the coloration of urine was previously removed by the addition of lead acetate to get a clear final point. The error of the method remained almost below 0.5%. In some cases, however, the error amounted to about 1%.

b) The reducing power of fructose estimated by the Benedict method.

Fructose used in this determination was the Kahlbaum sample, recrystallized from water and then from absolute alcohol, and showed $[\alpha]_D^{20} = -92.31^\circ$. 50.67 mg. of this sugar reduced 25 cc. of the Benedict reagent, while the same reagent was reduced by 50.08 mg. of glucose.

25 cc. of the second Benedict reagent was reduced by 49.88 mg. of glucose or by 50.18 mg. of fructose obtained by the recrystallisation of Merck's fructose, with $[\alpha]_D^{20} = -92.39^\circ$.

From these results the reduction power of the water free fructose estimated by the Benedict method corresponds to 0.99 of that of glucose.

S. W. Cole (1920) mentioned that 53 mg. of fructose reduced 25 cc. of the Benedict reagent, but he did not give any remark about the fructose used. Perhaps his sample might not be entirely water free.

IV. *Determination of rotatory power:* The determination of rotatory power of urine was made by means of the Landolt polarimeter.

The reading was taken ten times each from right and left alternately and averaged. Tube length was 2 dm., except when amount of urine was too small. The urine was decolorized by the addition of 5 or 10 cc. of 25% lead acetate, which does not adsorb

any amount of sugar over the error of the method.

The amounts of glucose and fructose in the urine were calculated out from its reducing power and specific rotation by the C. A. Brown (1906) method using the following formula.

$$ax + by = R$$

$$\alpha x + \beta y = P$$

Where x = percentage of one monosaccharid A , y = that of the other monosaccharid B , a = reduction power of A compared to that of glucose, b = reduction power of B compared to that of glucose, R = total percentage of both sugars, expressed as d -glucose,

$$a = \text{polarisation factor of } A \text{ expressed as } \frac{\alpha_D \text{ of } A}{\alpha_D \text{ of saccharose}}$$

$$\beta = \text{polarisation factor of } B \text{ expressed as } \frac{\alpha_D \text{ of } B}{\alpha_D \text{ of saccharose}}$$

$$P = \text{polarisation number of the mixture, that is percentage of mixed sugar expressed as glucose } X \frac{\alpha_D \text{ of mixed sugars}}{\alpha_D \text{ of saccharose}}$$

IV. THE COMPARISON OF AVAILABILITY OF GLUCOSE AND FRUCTOSE IN NORMAL DOG.

The normal dog R , weighing 8.1 kilo and its tolerance for glucose lying at 10 gm. per kilo body weight, was used as the test subject. 3 gm. of either glucose or fructose were given at post-absorption period in the morning and the blood-sugar curve and the reduction power of urine were examined. The results are given in table I.

Urines collected during 5 hours after sugar intake were examined for the volume, reaction, reducing substance, nitrogen and polarisation power with the following results.

From this result the degree of hyperglycemia is less in fructose than in glucose, while fructose is partly excreted in the urine when given in an amount which causes no glycosuria in the case of glucose.

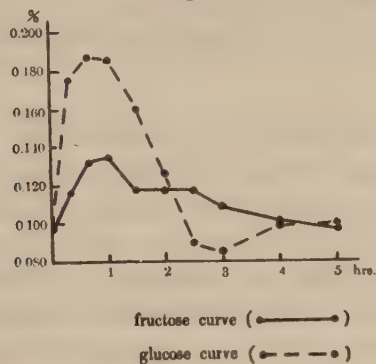
TABLE I.
Blood-sugar curve.

Date	14/X	15/X
Time after sugar intake	Fructose given	Glucose given
	%	%
0	0.097	0.098
20'	0.117	0.176
40'	0.132	0.187
1h	0.134	0.185
1h 30'	0.117	0.160
2h	0.117	0.126
2h 30'	0.117	0.089
3h	0.108	0.085
4h	0.101	0.098
5h	0.097	0.099

Urine.

Sugar given	Volume cc.	Reaction	N gm.	polarimetric reading (1.2 times diluted, tube-length = 2 dm.)
Fructose	185	weakly acidic	0.45	-0.54° corresponding to 0.68 gm. of fructose
Glucose	240	weakly acidic	0.50	—

Fig. 1.



In another experiment, fructose was given to a dog in amount of 5 gm. per kilo body weight and the amount of sugar (expressed as glucose) excreted in urine was determined. 1.22 gm. were excreted within the first 3 hours, 0.10 within 3-5 hours and no sugar hereafter. The total amount of sugar, 1.32 gm. excreted corresponds to about 3.2% of fructose given. These facts entirely agree with results reported by previous authors (Isaac, 1920; Barrenscheen 1926; Ferdinand Bertram 1929).

V. THE AVAILABILITY OF FRUCTOSE IN THE BODY OF GLUCOSURIC DOGS OF DIFFERENT GRADES.

The availability of fructose was examined with dogs in which the pancreas was excised in a different degree. The availability of the sugar was compared with that of glucose.

A. A partly pancreaticised animal, in which the tolerance has suffered apparently no effect.

Dog A, weighing 13.5 kilo, was operated on May 27, leaving about one fifth of its pancreas. After the lapse of eight weeks following the operation, the body weight was decreased to 9.5 kilo. The Benedict test of urine was ambiguous after intake of 80 gm. of glucose, while 95 gm. of glucose caused a weak positive test. The tolerance for glucose seems, therefore, to be at the range of normal. Blood sugar curves given by this animal following the intake of glucose and fructose in an amount of 2 gm. per kilo body weight run as in table II and figure 2.

The amount of fructose excreted was about 19% of the amount taken.

B. Slightly diabetic dog.

Dog M, weighing 13 kilo, was pancreaticized on May 26, 1931, leaving about one ninth of the gland. Alimentary glucosuria appeared directly after the operation and continued two weeks. The body weight, which had decreased to 11 kilo on June 17, regained to 13.5 Kilo on July 4th. Ration consisted of 130 gm. of rice, 130 gm. of horse flesh and 100 gm. of beef. The animal

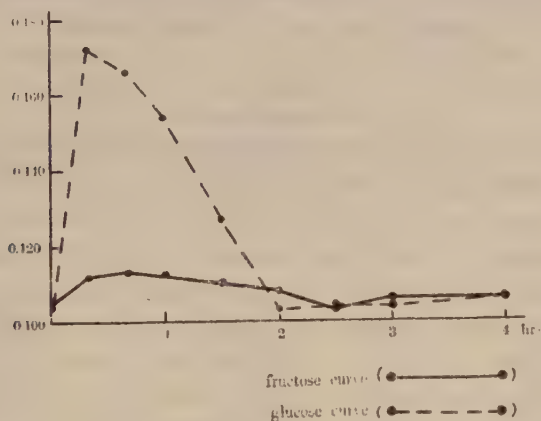
TABLE II.

Time	Glucose given 30/VII	Fructose given 31/VII
Before	% 0.104	% 0.105
After		
20'	0.172	0.112
40'	0.166	0.113
1h	0.154	0.112
1h 30'	0.127	0.110
2h	0.103	0.108
2h 30'	0.104	0.103
3h	0.104	0.106
4h	0.106	0.106

Urine excreted for 4 hours.

Urine volume	225 cc.	210 cc.
Reducing substance as glucose	—	3.8 gm.

Fig. 2.



showed, therefore, the diabetes levis (Allen) at first and recovered, leaving a lowered tolerance.

1. *Experiment with oral application of fructose or glucose,
2 gm. per Kilo body weight.*

TABLE III.
Blood sugar content.

Time	Fructose given 15/VII	Glucose given 16/VII
	%	%
Before	0.089	0.090
After		
20'	0.122	0.185
40'	0.110	0.274
1h	0.105	0.316
1h 30'	0.097	0.320
2h	0.096	0.240
2h 30'	0.092	0.179
3h	0.094	0.138
4h	0.097	0.092
5h	0.090	0.087

Sugar appeared in urine.

0 - 3h	—	0.40 gm.
3h - 6h	—	—

2. *Experiment with oral application of fructose or
glucose 3 gm. per Kilo body weight.*

TABLE IV.
Blood sugar content.

Time	Fructose given 30/VII	Glucose given 29/VII
	%	%
Before	0.106	0.105
After		
20'	0.140	0.188
40'	0.129	0.256
1h	0.127	0.295
1h 30'	0.126	0.333
2h	0.124	0.349
2h 30'	0.114	0.352
3h	0.101	0.293
4h	0.108	0.212
5h	0.117	0.143
6h	0.110	0.114

Sugar excreted in urine.

0-2h	0.20 gm.	0.69 gm.
2-4h	0.18	1.17
4-6h	—	±

Fig. 3.

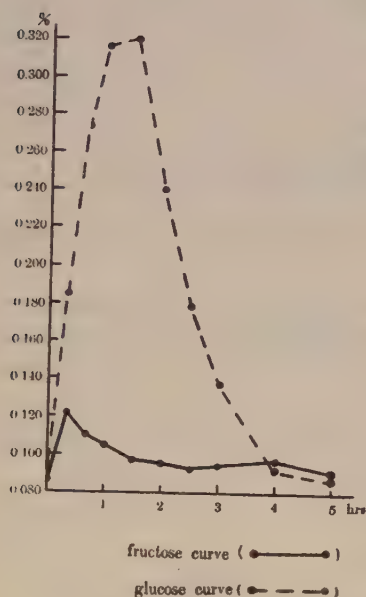
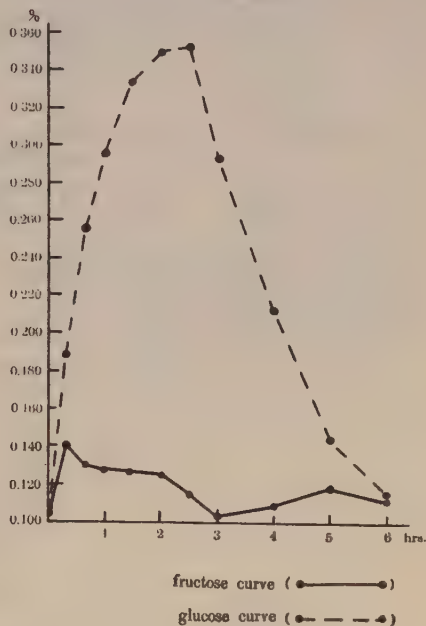


Fig. 4.



From the above experiments (1) and (2) it can be seen that dog *M* shows a high degree of hyperglycemia and a very slow return to its normal blood sugar value after the intake of glucose, while it behaves quite normally to the intake of fructose.

The amount of sugar excreted in urine is far greater in the case of glucose, than in that of fructose. The renal threshold for fructose seemed to be elevated in this animal and the fructose was tolerated much better, whereas the assimilative activity for glucose became very decreased.

Dog O, weighing 13.3 Kilo, was pancreaticised on October 5th, 1931, leaving about one tenth of the gland. The rations and condi-

tions are summarised as follows:

Date	Ration	Sugar in urine
5/X	Operation	
6/X	300 cc. milk	±
8/X	Bisenit with milk	+++
9/X	Veal 100 gm. Butter 50 gm.	+
20/X	"	±
26/X	"	-
31/X	Rice 100 gm. + Veal 100 gm.	++
1/XI	Rice 40 gm. + Veal 150 gm.	-

This animal showed, therefore, diabetes gravis at first, which shifted to diabetes levis afterwards.

*Experiment with oral administration of fructose or glucose,
3 gm. per Kilo body weight.*

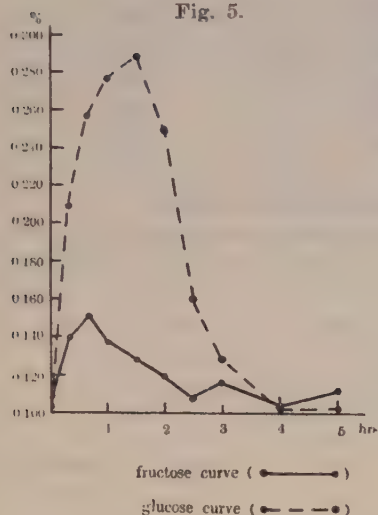
TABLE V.
Blood Sugar Curve.

Time	23/XI Glucose given	25/XI Fructose given
Before	% 0.103	% 0.108
After		
20'	0.209	0.140
40'	0.256	0.151
1h	0.276	0.137
1h 30'	0.288	0.128
2h	0.249	0.119
2h 30'	0.160	0.107
3h	0.128	0.117
4h	0.102	0.103
5h	0.102	0.111

Sugar excreted in urine.

0-6h	0.76 gm.	0.39 gm.
------	----------	----------

Fig. 5.



We can see from this table that during the first six hours after the administration of the sugar, 3.0% of the amount of sugar given were eliminated in the case of glucose, while only 1.6% were excreted in the case of fructose.

C. Heavily diabetic dogs.

Dog N, weighing 11,5 Kilo, was pancreaticised on June 19, 1931, leaving about one eleventh of the gland. The blood sugar content at postabsorptive stadium increased to 0.248% on July 4th and to 0.272 on July 7th. Glucosuria was heightened far more on July 7th than it was on July 4th. The dog corresponds, therefore, to the permanent diabetes gravis of Allen.

The ration consisted of 100 gm. of fish, 65 gm. of veal and 50 gm. of rice.

1. Experiment with oral administration of fructose or glucose, 2 gm. per Kilo body weight.

TABLE VI.
The blood sugar curve.

Time	9/VII Glucose given	10/VII Fructose given
	%	%
Before	0.300	0.308
After		
20'	0.426	0.426
40'	0.532	0.464
1h	0.596	0.506
1h 30'	0.544	0.486

2h	0.478	0.464
2h 30'	0.430	0.418
3h	0.392	0.400
4h	0.360	0.374
5h	0.334	0.346

Urine (During 5 hours after sugar administration).

Date	8/VII	9/VII	10/VII	11/VII
Blood sugar (postabsorpt. stadium)	0.288	0.300	0.308	0.322
Sugar administered	—	Glucose	Fructose	—
Urine volume	90	230	169	60
Reaction	acidic	acidic	acidic	acidic
Sulphosalicyl. test	±	±	—	±
Ferricchlorid test	±	±	+	+
N amount	0.98	0.88	1.15	0.91
Reduction power	1.73	18.22	12.66	1.56
Polarimetric reading (1.2 times diluted, tube = 2 dm.)	+1.70°	+6.92°	+5.26°	—
(D/N)	1.8	—	—	1.7
(D/N) × N = (A) gm.	—	1.58	2.07	—
Sugar excreted (B)	Glucose 1.74	Glucose 18.21	Glucose 11.75 Fructose 0.91	—
Sugar reappeared (B) - (A)	—	16.63	Glucose 9.68 Fructose 0.91	—
Unutilized percentage	—	92.4	58.9	—

2. *Experiment with oral administration of fructose or glucose, 3 gm. per Kilo body weight.*

The **dog N**, used in the preceding experiment, was fed with a ration decreasing in the amount of rice with a corresponding increase in the amount of beef, and after July 19th only 300 gm. of horse flesh were given. The body weight decreased to 8 Kilo.

TABLE VII.
The blood sugar curve.

Time	22/VII Fructose given	23/VII Glucose given
	%	%
Before	0.342	0.340
After		
20'	0.428	0.478
40'	0.492	0.580
1h	0.550	0.628
1h 30'	0.574	0.584
2h	0.504	0.532
2h 30'	0.488	0.448
3h	0.470	0.418
4h	0.410	0.390
5h	0.374	0.382
6h	0.380	0.378

Urine.

Sugar and time	Control 21/VII 0-6	Fructose 22/VII 0-6	Glucose 23/VII 0-6
Blood sugar (postabsorpt. stadium)	0.358	0.342	0.340
Urine volume	138	247	310
Reaction	acidic	acidic	acidic
Sulphosalicyl. test	±	—	±
Ferriechlorid test	+	+	±
Amount of N	1.98	1.94	2.32
Reduction power (calc. as glucose)	2.77	19.91	25.19
(D/N)	1.4	—	—
(D/N) × N (A)	—	2.72	3.25
Sugar reevcreted (B)			
{ abs. amount	—	17.19	21.94
{ percentage	—	71.6	91.4

We can see from the result of experiments 1 and 2, that the curve of hyperglycemia looks alike both in the case of glucose and of fructose administration.

The degree of hyperglycemia and the amount of sugar excreted in urine seem to be less extensive in the case of fructose. The

Fig. 6.

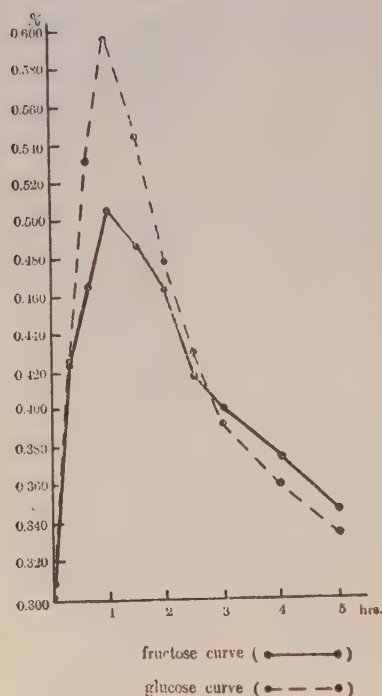
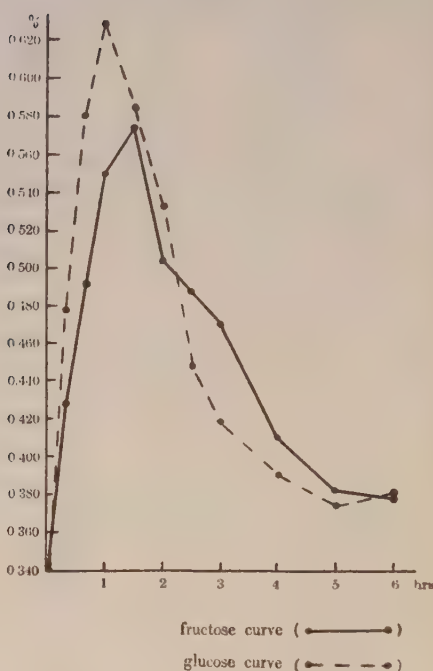


Fig. 7.



amount of fructose in urine, calculated by the Brown method, remains quite small in amount. The values of (A) in the above tables are rather uncertain, but can be assumed to give near values. These experiments show that fructose is utilized far better than glucose in heavily diabetic dogs.

Dog I.

Date	Conditions
Before	Body weight 9.00 kg.
25/IX, 1930	Pancreaticized, leaving about one twelfth of the gland.
27/IX, "	Blood sugar 0.226%, glycosuria ++.
23/X, "	Blood sugar 0.220, glycosuria ++.
31/X, "	Blood sugar 0.255%, glycosuria +++.

The dog operated on belongs to the permanent diabetes gravis of Allen. Ration consisted of 500 gm. of horse flesh.

Experiment with oral administration of fructose or glucose in an amount of 6 gm. per Kilo body weight.

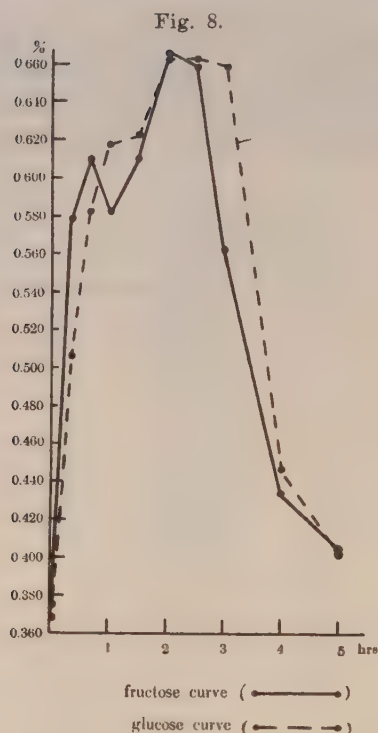
TABLE VIII.
The blood sugar curve.

Time	17/XII Fructose given	18/XII Glucose given
Before	% 0.374	% 0.368
After		
20'	0.578	0.506
40'	0.610	0.582
1h	0.582	0.618
1h 30'	0.610	0.622
2h	0.664	0.662
2h 30'	0.658	0.662
3h	0.562	0.658
4h	0.434	0.446
5h	0.404	0.402

Urine (whole day's urine).

Date	Sugar given	Volume of urine	N in urine	power Reduction
17/XII	Fructose	1180	11.2	44.7
18/XII	Glucose	1560	21.6	73.9
19/XII	no sugar	800	11.2	27.5

As can be seen in table VIII and figure 8 the blood sugar curves after the administration of glucose or fructose almost coincide in this case. The degree of glycosuria seems, however, far less in the case of fructose.



VI. THE EFFECT OF THE ORAL ADMINISTRATIONS OF FRUCTOSE ON THE HYPERGLYCEMIA AND AVAILABILITY OF FRUCTOSE AT DIFFERENT PERIODS OF THE SAME GLUCOSURIC ANIMAL.

As it seems to me quite interesting and important also to know how the utility of fructose changes with the progress of diabetic disease, the following experiments were conducted.

I. The experiment on dog L.

Dog L, weighing 7.5 Kilo, was pancreaticised on October 10th, 1930, leaving only 1/10–1/11 of the gland. The rations and conditions of the animal are summarized as shown in page 85:

Judging from these observations, this dog had first diabetes gravis, which shifted to diabetes levis and, after 4 months, sugar

Date		Rations and conditions	
9/X	1930	Operation. 1/10-1/11 of pancreas reserved.	
15/X	"	Polyphagy and polydipsy became apparent upon the carbohydrate rich diet. Glycosuria ++	
19/X	"	On the administration of 500 gm. of horse flesh glycosuria + Carbohydrate rich diet was given hereafter.	
23/XII	"	Body weight increased to 9 Kilo gm., after carbohydrate rich diet: glycosuria +	
3/II	1931	Body weight 9.6 Kilo. Postabsorptive blood sugar: 0.101% after administration of 100 gm. of rice and 100 gm. of fish: no glycosuria	
1/IV	"	Body weight 8.7 Kilo. Postabsorptive blood sugar: 0.264% After the intake of 500 gm. of horse flesh: glycosuria +++ (38 gm. as Glucose)	
3/V		Body weight	Postabsorpt. blood sugar
		7.6 kilo.	0.312 %
12/VI		6.5 "	0.326 "
1/IX		4.8 "	0.368 "
		Quite emaciated, the hair came off the fur.	
30/IX		Cataract distinct, standing and walking became impossible. On killing and examining, the remaining pancreas was found to be about 2.3 gm. weight.	

almost disappeared from the urine even after rich rice diet. Later the animal fell to diabetes gravis again.

(A) *Period, where no glycosuria was observed after carbohydrate rich diet, with mear lowering of tolerance.*

Ration, consisting of 100 gm. of rice and 200 gm. of fish, and which caused no glycosuria, was given. Body weight was 9 kilogram. 2 gm. of fructose or glucose per Kilo body weight were given by mouth. The blood sugar curves were shown in table IX.

We can see from these results, that in this period where the assimilating power is not damaged much, the administration of fructose caused only a glycosuria.

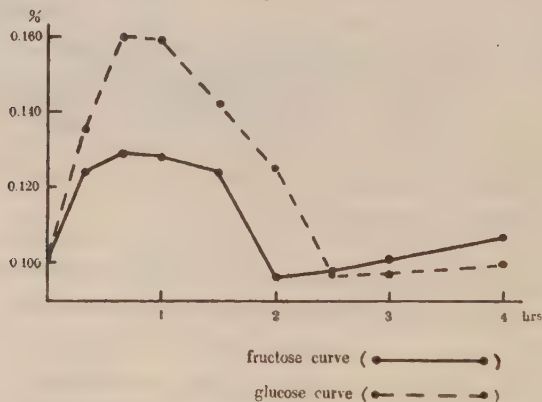
(B) *Period of diabetes gravis.*

In about five months after the preceding experiment, the

TABLE IX.
Blood sugar curve.

	Glucose given 16/I	Fructose given 17/I
Before	% 0.103	% 0.101
After		
20'	0.135	0.124
40'	0.160	0.129
1h	0.159	0.128
1h 30'	0.142	0.124
2h	0.125	0.096
2h 30'	0.097	0.098
3h	0.097	0.101
4h	0.100	0.107

Fig. 9.



4 hours' urine after sugar administration.

Date	Kind of sugar	Volume	Reduction power
16/I	Glucose	210	—
17/I	Fructose	260	1.0 gm.
18/I	Control	58	—

animal succumbed to diabetes gravis and showed an apparent marasmus. Polydipsy and polyhagy were intense. Ration con-

sisted of 130 gm. of rice, 150 gm. of fish and 70 gm. of horse flesh.

a) Fructose or glucose was given in 3 gm. per Kilo. body weight.

TABLE X.
Blood sugar curve.

Time	Glucose given 12/VI	Fructose given 13/VI
	%	%
Before	0.326	0.324
After		
20'	0.436	0.498
40'	0.512	0.552
1h	0.552	0.560
1h 30'	0.576	0.498
2h	0.466	0.418
2h 30'	0.410	0.384
3h	0.388	0.360
4h	0.356	0.330
5h	0.328	0.320

Urine (During 5 hours after sugar administration).

Sugar and date	Control 11/VI	Glucose 12/VI	Fructose 13/VI
Volume	192	250	254
Sulfosalicyl. acid	—	—	—
Ferric chlorid test	±	+	+
N	0.93	0.95	0.99
Reduction power (as glucose)	2.81	20.34	16.31
Polarimeter reading (1.2 times diluted, tube = 2 dm.)	+1.27°	+7.14°	+2.76°
Sugar determined from reduction and polarization value.	Glucose 2.80	Glucose 20.37	Glucose 13.30 Fructose 3.05
Sugar reexcreted			
{ abs. amount		17.57	Glucose 10.50 Fructose 3.05
{ Percentage		89.7	68.5

b) Fructose or Glucose was given 4.0 gm. per Kilo body weight.

TABLE XI.
Blood sugar curve.

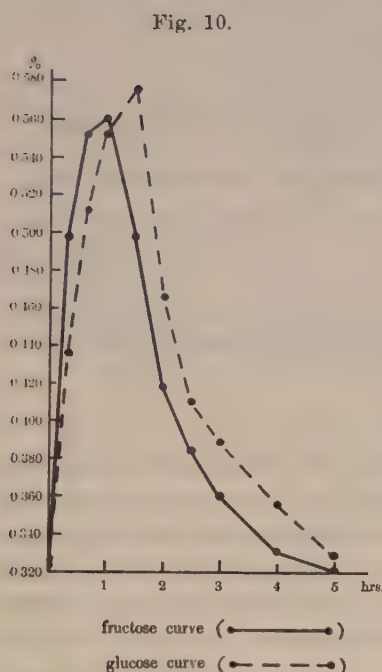
Time	Fructose given 24/VI	Glucose given 26/VI
Before	%	%
After	0.368	0.370
20'	0.564	0.492
40'	0.624	0.552
1h	0.634	0.614
1h 30'	0.540	0.658
2h	0.490	0.622
2h 30'	0.436	0.508
3h	0.410	0.444
4h	0.366	0.390
5h	0.366	0.372

Urine.

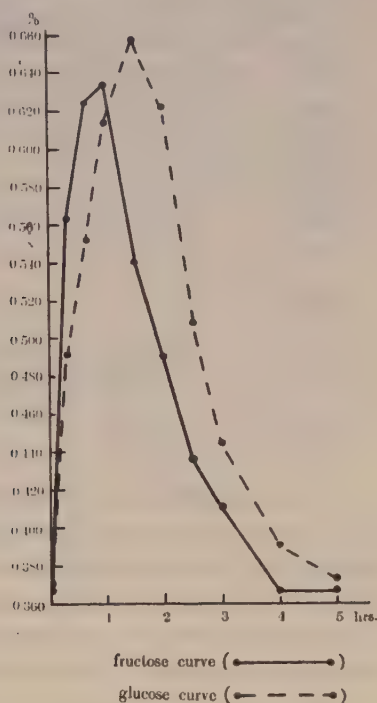
Excreted during 5 hours after the administration of sugar.

Sugar and date	Control 23/VI	Fructose 24/VI	Control 25/VI	Glucose 26/VI
Urine volume	230	250	164	272
Reaction	acidic	"	"	"
Sulfosalicyl. test	—	—	—	—
Ferric chlorid test	+	±	+	+
N	1.06	0.99	0.92	0.77
Reduction power (as glucose)	3.47	16.57	2.89	19.97
Polarimeter reading (1.2 times diluted, tube = 2 dm.)	+1.31°	+2.72°	+1.54°	+6.42°
Sugar excreted (calculated from reduction and polarization power)	Glucose 3.46	Glucose 13.35 Fructose 3.24	Glucose 2.89	Glucose 19.97
Sugar re-excreted		Glucose 10.18 Fructose 3.24 58.4		Glucose 17.51
{ abs amount				
{ Percentage				76.8

Fig. 11.



3 gm. of Sugar per Kilo given.



4 gm. of sugar per Kilo given.

Judging from these experiments the availability of fructose is no better than glucose in the animal least affected, while in heavily diabetic animal fructose is far better utilized than glucose.

II. Experiment on Dog J.

Dog J, weighing 11.5 Kilo. was pancreaticized on November 30, 1930, leaving about one-ninth of the gland. Rations and conditions of the animal are summarized as follows:

Date	Rations and conditions
1/X 1930	Milk and biscuit. Glycosuria +
6/X	" " "
7/X	" " Glycosuria -, symptom of polyphagia noticed.
13/X	Carbohydrate rich ration given: Glycosuria negative.
3/XI	Carbohydrate rich ration: Glycosuria positive.
23/XII	" " " " " Body weight 11 Kilo.
19/I 1931	Meat alone given, glycosuria +, body weight 11.2 Kilo. Hereafter marasmus slowly augmented. Pruritus, neuritis and cataract became marked.
29/VIII	Killed.

This dog suffered therefore from diabetes levis first which was cured so as to show no glycosuria even after carbohydrate rich feeding. With long continued carbohydrate rich rations, however, the animal became gradually diabetic again and the disease proceeded to the worst conditions. Except the last stage, where diarrhoea appeared, digestive organs showed no abnormalities.

A. Period of diabetes gravis in primary stadium.

- a) Fructose or glucose was given in 3 gm. per Kilo. body weight. The ration consisted of 880 gm. of horse-flesh (cooked).

TABLE XII.
Blood sugar curve.

Time	Glucose given 20/I	Fructose given 22/I
	%	%
Before	0.089	0.091
After		
20'	0.214	0.138
40'	—	0.158
1h	0.340	0.157
1h 30'	0.333	0.142
2h	0.250	0.115
2h 30'	0.203	0.110
3h	0.156	0.112

4h	0.112	0.117
5h	0.092	0.115

Urine (whole day's urine).

Kind of sugar	Control 19/I	Glucose 20/I	Control 21/I	Fructose 22/I
Urine volume	1095	1055	640	885
N gm.	12.8	15.8	17.3	18.3
Reducing power (as glucose) (A)	1.7	8.6	3.6	6.1
(D/N)	0.13	—	0.21	—
(D/N)XN (B)	—	2.7	—	3.1
Sugar-re-excreted (A)-(B)		5.9		3.0
{abs. amount		17.6		8.9
{percentage				

- b) Fructose or glucose was given 3 gm. per Kilo. body weight, after the administration of fructose in the previous day.

As the ration consisting of merely protein and fat, as given in the previous experiment, lowers highly the assimilative power of the animal for carbohydrate, while a mere administration of sugar removes this trouble, we proceeded in this experiment to examine the availability of sugar after the previous administration of fructose.

TABLE XIII.
Blood sugar curve.

Time	Fructose given 29/I	Glucose given 30/I
	%	%
Before	0.096	0.113
After		
20'	0.159	0.218
40'	0.217	0.284
1h	0.191	0.330
1h 40'	0.135	0.359
2h	0.121	0.331
2h 30'	0.118	0.260
3h	0.114	0.235
4h	0.125	0.195
5h	0.139	0.161

Urine (Whole day's urine).

Kind of sugar	Control 28/I	Fructose 29/I	Glucose 30/I
Volume	435	635	935
N gm.	7.7	8.5	17.8
Reducing power (as glucose)	4.8	5.6	19.6
(D/N)	0.6		
(D/N) × N		5.1	10.7
Sugar re-excreted			
{ abs. amount		0.5	8.9
{ Percentage		1.5	27.0

Fig. 12.

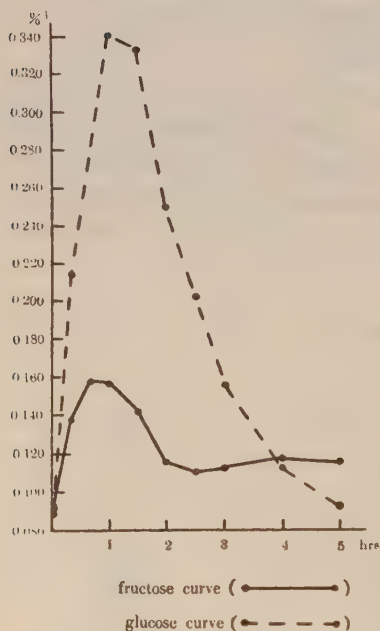
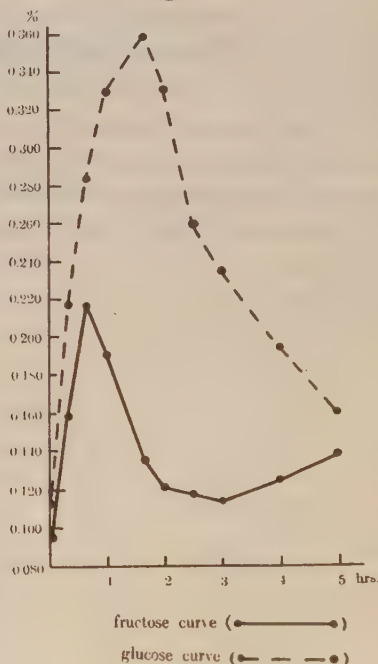


Fig. 13.

*B. Period of the advanced stadium of diabetes gravis.*

Fructose or glucose was given orally in 3 gm. per Kilo. body

weight. Body weight was 7.3 Kilo. Ration was composed of 180 gm. of rice, 70 gm. of horse-flesh and 180 gm. of fish.

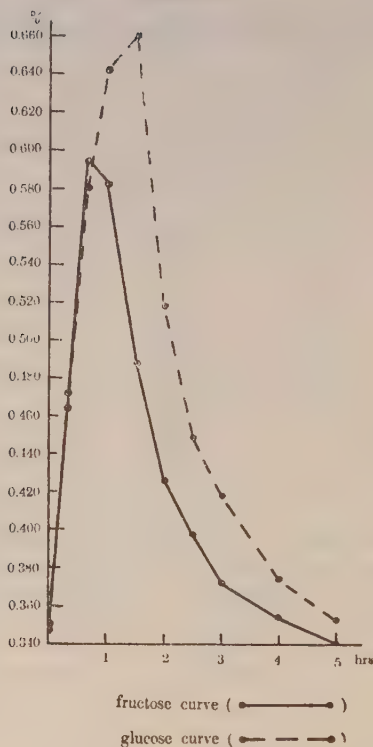
TABLE XIV.
Blood sugar curve.

Time	Fructose given 4/VI	Glucose given 5/VI
	%	%
Before	0.348	0.350
After		
20'	0.472	0.464
40'	0.594	0.580
1h	0.582	0.642
1h 30'	0.488	0.660
2h	0.426	0.518
2h 30'	0.398	0.448
3h	0.372	0.418
4h	0.354	0.374
5h	0.340	0.352

Urine (Excreted during 5 hours after the administration of sugar).

Kind of sugars	Control 3/VI	Fructose 4/VI	Glucose 5/VI
Volume	154	243	235
Reaction	acidic	acidic	acidic
Sulfosalicyl. test	—	—	—
Ferichlorid test	±	±	±
N gm.	1.05	1.03	1.12
Reduction power (as Glucose)	1.29	11.96	18.18
Polarimeter reading (1.2 times diluted. Tube-length 2 dm.)	+0.73°	+2.92°	+6.72°
(D/N)	1.23		
(D/N) × N (A)		1.27	1.38
Amount of sugar (calculated from reduction power and polarimeter reading (B)	Glucose 1.29	Glucose 10.57 Fructose 1.40	Glucose 18.17
Sugar re-excreted (B)—(A)			
{ abs. amount		Glucose 9.30 Fructose 1.40	Glucose 16.79
{ Percentage		48.9	76.7

Fig. 14.



These results of experiments on Dog J indicate also that fructose is far more available than glucose when diabetes advances.

To easily compare the availability of glucose and fructose the results obtained in the previous experiments are summarized in Table XV.

VII. THE EFFECT OF DAILY ADMINISTRATION OF FRUCTOSE ON THE RENAL THRESHOLD, THE BLOOD SUGAR AND THE PROGRESS OF DIABETES.

A. The effect on the renal threshold and the blood sugar.

1. Experiments on Dog A.

(Very slightly diabetic animal).

At first the effect of daily administration of fructose was

TABLE XV.

Dog No.	Reserved parts of Pancreas	Number of weeks after the operation	Body weight Kilo-gm.	Sugar administered per Kilo-gm.	Availability		Remarks
					Glucose	Fructose	
R	normal		8.1	3	100.0	97.0	normal
A	1/5	9	10	2	100.0	81.0	very slightly diabetic
M	1/9	7	13.0	2	98.5	100.0	slightly diabetic
		9	13.0	3	95.2	99.0	
O	1/10	9	8.4	3	97.0	98.4	slightly diabetic
J	1/9	36	7.3	3	23.3	51.1	heavy
N	1/11	3	9.0	2	7.6	41.1	heavy
		5	8.0	3	8.6	28.4	
L	1/10	19	9.0	2	100.0	94.4	very slightly diabetic
		31	6.5	3	10.3	31.5	heavy
		33	5.7	4	23.2	41.6	

TABLE XVI.

Amount of sugar re-excreted in urine during 4 hours following the administration of fructose.

Date		Amount of fructose, gm. per Kilo body weight	Volume of urine (4 hours) cc.	Amount of reducing subst. gm.	Percentage of re-excreted sugar
July	31	2	210	3.8	19.0
Aug.	1	1.5			
"	2	1.0			
"	3	0.5	270	0.34	6.8
"	4	5.0	300	1.10	2.2
"	5	2.0	250	0.46	2.3
"	6	2.0	245	0.46	2.3

examined on dog A, a very slightly diabetic dog mentioned above.

The amount of the fructose administrated varied between 0.5–5.0 gm. per Kilo. body weight and the length of the experiment covered one week, July 31st to August 6th. The blood sugar curve was examined on August 4th and 6th. The results are shown in table XVI.

TABLE XVII.
Blood sugar curve.

July 31		August 6	
Before	0.105	Before	0.105
After		After	
20'	0.112	20'	0.133
40'	0.113	50'	0.126
1h	0.112	1h 50'	0.109
1h 30'	0.110		
2h	0.108	2h	0.107
2h 30'	0.103	2h 30'	0.109
3h	0.106	3h	0.109
4h	0.106	4h	0.110

Fig. 15.

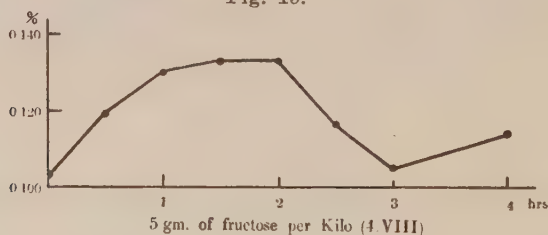
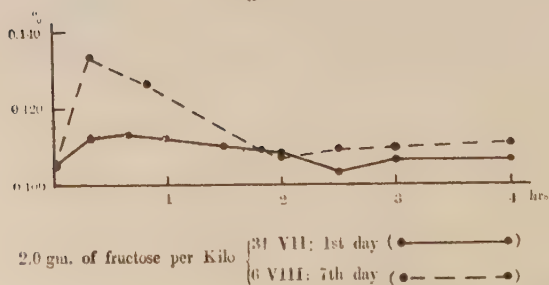


Fig. 16.



It can be seen from these results that although the tolerance for fructose remains quite low, the threshold seems to rise in the course of successive administration of fructose. Allen and other workers think that the subsidence of glycosuria in case of successive peroral administrations of fructose is due to the decrease of absorption. When we examine, however, the blood sugar curve at this moment the decrease of glycosuria can not be explained only by the amount of absorption, but rather it is due mainly to the raised renal threshold for fructose. At any rate the long continued administration of fructose seems to promote the availability of fructose.

II. Experiments on Dog L.

On this dog two experiments for daily administration of fructose were conducted twice: One at a time when no glycosuria was observed, and the other in the last period of heavy glycosuria.

a. When no glycosuria was observed.

The animal weighed 9.6 Kilo. The ration consisted of 100 gm. of rice and 100 gm. of fish. Fructose was given 3 gm. per Kilo body weight every day at nine o'clock in the morning. The hyperglycemic curves on the first, fourth and seventh are shown in table XVIII and figure 17.

TABLE XVIII.
Hyperglycemic curve.

Time	First day Feb. 3	Fourth day Feb. 6	Seventh day Feb. 9
Before	0.101	0.102	0.103
After			
20'	0.130	0.161	0.143
40'	0.134	0.143	0.142
1h 10'	0.120	0.131	0.140
1h 30'	0.113	0.124	0.125
2h	0.100	0.113	0.108
2h 30'	0.106	0.115	0.107
3h	0.114	0.103	0.105
4h	0.108	0.105	0.110
5h	0.102	0.108	0.105
Reducing substance in urine. gm. (as glucose)	1.1	3.1	1.1

Fig. 17.

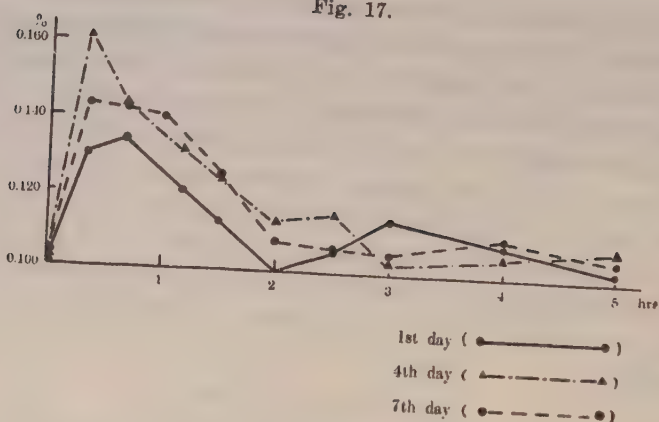
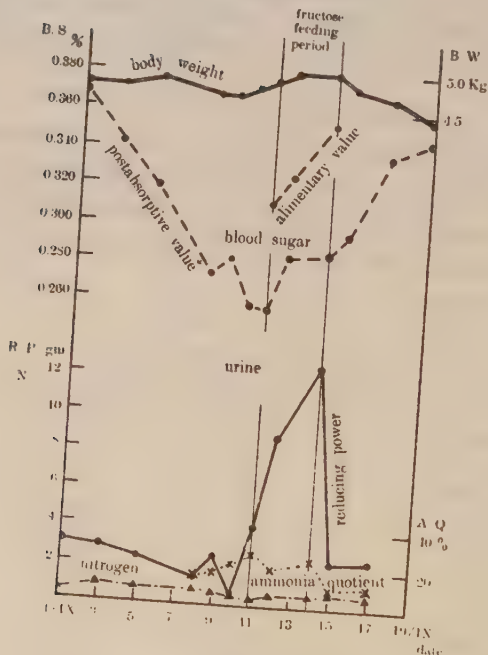


Fig. 18.



b. At the last stadium.

The animal weighed at this stadium 4.8 Kilo only. Ration consisted of 30 gm. of horse-flesh, 70 gm. of tallow, 80 gm. of tunny

and 20 gm. of fish-bones.

Fructose was given orally in 3 gm. per kilo body weight at nine o'clock every day from September 11th to 14th. Blood sugar was determined at half past eight o'clock and in fructose period, at 3 p.m. also. Urine was collected during 6 hours from 9 a.m. to 3 p.m. Diet was given 3.5 p.m. once every day. Diarrhoea was observed on Sept. 11th and 12th.

The change in body weight, blood sugar, urine nitrogen, urine sugar, ammonia quotient of the urine was followed from September 1st to 19th; and is shown in figure 18.

As can be seen from the figure, the body weight increased with the administration of fructose, and the blood sugar, which had been decreasing with the carbohydrate poor diet, began to increase not only during the period in which fructose was administered, but also in the succeeding days. As this animal, however, suffered from diarrhoea, we can not deduce much from these findings.

III. Experiment on Dog O, suffering from diabetes levis.

The dog O showed glycosuria from the diet containing 100 gm. of rice, but remained sugar free for 40 gm. of rice. During the following experiment the ration consisted of 40 gm. of rice and 150 gm. of horse-flesh.

The experiment was conducted as follows:

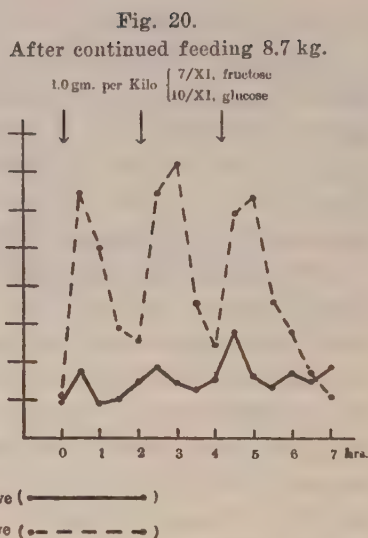
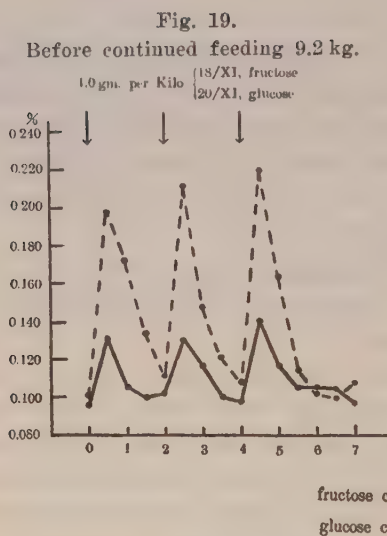
a). At first fructose or glucose was given orally three times with 2 hours interval in 1 gm. per kilo body weight, and the blood sugar curve was followed.

b). During following 5 days fructose was then given twice every day; 3 gm. per kilo body weight at 9 o'clock a.m. and 5 gm. per kilo at 3.5 p.m. together with diet.

Theoretically this period is better prolonged. To avoid several disturbances such as anorexia and diarrhoea, however, the amount of fructose and length of the period had to be limited.

c). At last fructose or glucose was given again just as in period a, and the blood sugar curve was followed.

The blood-sugar curves obtained in a) and b) are shown in figure 19 and 20.



We can see from these figures that the assimilation capacity tested by glucose administration shows some lowering with continued feeding of fructose to the animal. Although no glycosuria was observed, the blood sugar curve went down more slowly, after the experiment.

During the fructose feeding period the sugar excretion in urine, which was caused only by fructose, decreased with time, the excreted sugar corresponding to 5.3 3.4 and 2.4% of the administered fructose in 1st, 3rd and 5th day of experiment. It is interesting to note that in blood-sugar curve test with fructose administration, fructose excretion into the urine is smaller after the fructose feeding period than before the feeding (amount of reducing substances in two hours urine being 0.05 gm. in the former and 0.4 gm. in the latter case). These are due probably to the elevation of the threshold for fructose.

B. The effect of the continued peroral administration of fructose or glucose on the diabetic dog.

As stated above, the continued per oral administration induces the depression of tolerance for sugar.

We have tried then, to compare the effect of the continual peroral administration of fructose with that of glucose. It is quite important to note on this occasion that there are at least two factors to be taken in our consideration. The one is that the comparison ought to be made on the same dog to avoid individual variation. The other is the fact that the tolerance is apt to change during the experiment and that this may cause some difference whether we make the experiment for fructose prior to that for glucose or vice versa. It is therefore preferable that we check our experiment on the same dog, once making the experiment for fructose first and that for glucose second, and then repeating the experiment for fructose.

The tolerance of the animal for sugar at various periods was examined by the intravenous injection of glucose in an amount of 0.2 gm. or 0.5 gm. per Kilo body weight. Glucose was used as 20% solution, disinfected and injected into V. saphena parva with the velocity of 1 cc. per 4 seconds.

I. Experiment on Dog T.

Dog T, weighing 11.5 Kilo, was pancreaticized on March 1, 1932, leaving about one sixth of the gland. Glycosuria continued about 10 days. On March 14th no sugar appeared in urine with the diet consisting of 100 gm. of rice and 150 gm. of horse-flesh. The dog corresponds therefore, to so-called "transient diabetes levis" Allen.

Experiment A.

During the experiment the diet consisting of 50 gm. of rice, 150 gm. of horse-flesh and 150 gm. of sardine was given at 3.5 p.m. every day. Sugar, either glucose or fructose, was given at 9 a.m. and at noon, in an amount of 1.5 gm. per kilo body weight as 20% solution. Urine was collected during 3 hours after each sugar administration, and from 3 p.m. to 8.5 a.m. next day. Experiment was conducted as follows.

1. Period. Fructose was administered during May 3-May 7. 3 hours' urine contained sugar corresponding about 2% of

administered fructose.

On May 8th, the blood-sugar curve was examined by injecting 0.2 gm. of glucose. In four hours' urine, about 6.3% of injected glucose reappeared.

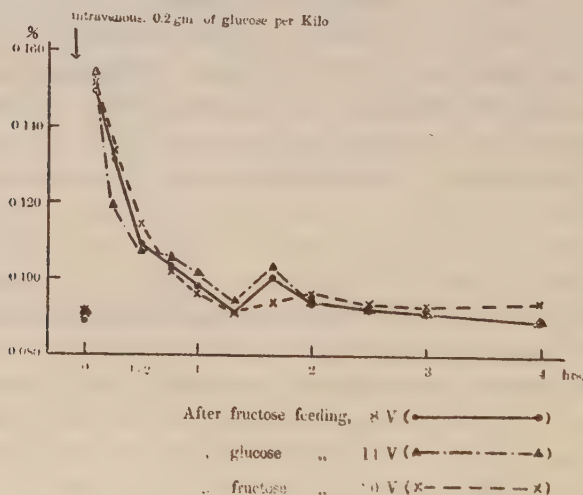
2. Period. Glucose was administered during May 9 to May 13th. 3 hours' urine contained about 0.3% of administered glucose. On May 14th the blood sugar curve was examined by injecting glucose. In four hours' urine, about 6.7% of injected glucose reappeared.

3. Period. Fructose was again administered during May 15th to May 19th. 3 hours' urine contained about 2.6% of fructose administered.

On May 20th the blood-sugar curve was examined by the injection of glucose. In 4 hours' urine, about 5.3% injected glucose reappeared.

The blood-sugar curves obtained in each period were plotted in figure 21 together.

Fig. 21.



Experiment B.

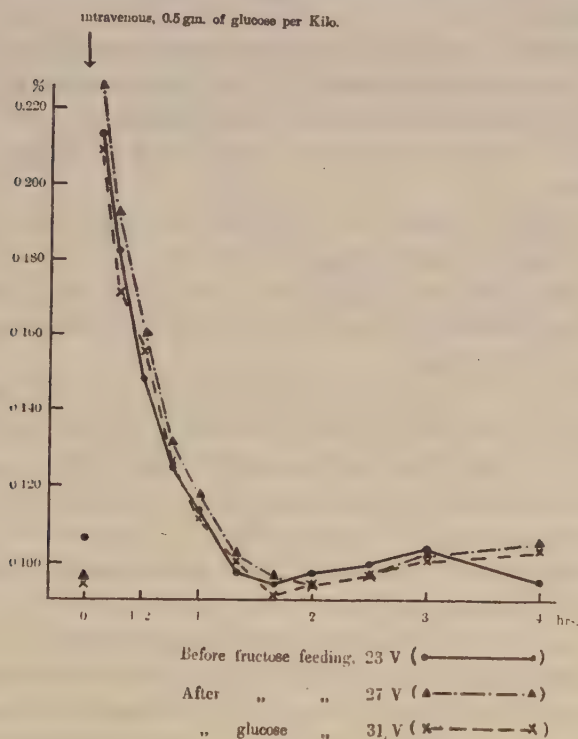
In this experiment the amount of sugar given twice daily

peroral was 2 gm. per Kilo body weight each time. The amount of injected glucose used for the examination of blood sugar curve was 0.5 gm. per kilo body weight. Other things remained quite the same as in previous experiment A.

1. Period. Fructose was administered during May 24 to 26th. 3 hours' urine contained about 3% of the administered fructose. On May 27th to blood-sugar curve was examined by the injection of glucose. In four hours' urine, about 3.8% of injected glucose reappeared.

2. Period. Glucose was administered during May 28th to 30th. 3 hours' urine contained about 0.6% of the administered glucose. On May 31st the blood-sugar curve was examined by the injection of glucose. In four hours' urine about 3.6% of

Fig. 22.



glucose reappeared.

The blood sugar curves obtained in each period were plotted in figure 22 together.

II. Experiment on dog X.

Dog X, weighing 11.2 Kilo, was pancreaticized on April 25th, 1932, leaving about one eleventh of the gland.

When he was fed on milk, the glycosuria disappeared on May 13th, but the diet consisting of 100 gm. of horse-flesh, 200 gm. of sardine and 50 gm. of rice caused a glycosuria of medium grade. In the experiment with this dog, the amount of sugar given twice every day was chosen as 1.5 gm. each time. Glucose injected for the examination of the blood-sugar curve was 0.5 gm. per Kilo body weight. Other things remained quite the same as in previous experiments.

1. Period. Fructose was administered during May 18th-20th. 3 hours' urine contained about 1.7% of the administered fructose. On May 21st the blood sugar curve was examined by the injection of glucose. In four hours' urine, about 6.3% of injected glucose reappeared.

2. Period. During May 22-24th no sugar administration was made and it stands as a control period.

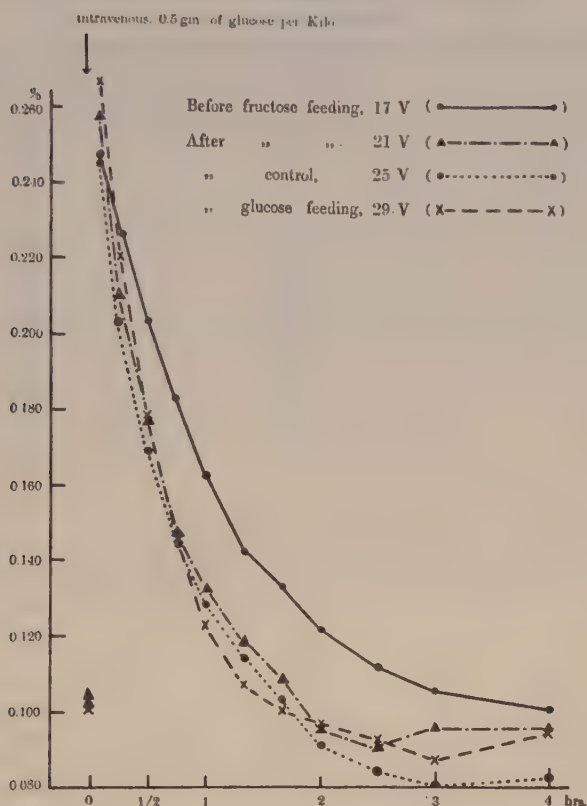
On May 25th the blood-sugar curve after the injection of glucose was followed. Four hours' urine contained about 6.6% of the injected glucose.

3. Period. Glucose was administered during May 26th-28th. Three hours' urine contained about 0.5% of the administered glucose. On May 29th the blood-sugar curve was examined by the injection of glucose. In four hours' urine, 8.6% of glucose injected reappeared.

The blood-sugar curves obtained in each period were plotted in figure 23 together.

As can be seen from these experiments made on dog T and X the continued administration of neither fructose nor glucose shows any considerable influence on the tolerance of sugar.

Fig. 23.



VIII. THE AVAILABILITY OF FRUCTOSE IN NORMAL SUBJECTS.

A. *The effect of oral administration of fructose on blood sugar curve and reducing substance of urine.*

Subject T. Y. 18 years old, weighing 45 kilogram, took at 7 a.m. in postabsorptive stadium either 1.0 or 1.5 gm. of fructose per Kilo of his body weight as 50% solution. The subject remained at rest. The blood sugar curve and the amount of reducing substance in urine were as given in table XIX.

From these results it can be said that the intake of fructose in an amount of 1 gm. per Kilo body weight causes a fructosuria of slight grade and that the degree of fructosuria does not increase

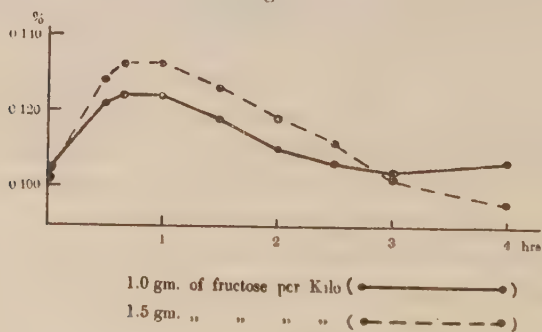
TABLE XIX.
Blood-sugar curve.

Time	1.0 gm. of fructose per Kilo taken	1.5 gm. of fructose per Kilo taken
Before	% 0.104	% 0.102
After		
30'	0.122	0.128
40'	0.124	0.132
1h	0.124	0.132
1h 30'	0.118	0.126
2h	0.110	0.118
2h 30'	0.106	0.112
3h	0.104	0.102
4h	0.112	0.096

Urine (collected during 3 hours).

Volume cc.	173	162
Benedict react.	+	+
Reducing power (as glucose)		
{ abs. amount gm.	0.27	0.57
{ percentage	0.6	0.8

Fig. 24.



much even when fructose is taken in greater amount.

B. The tolerance of fructose in peroral administration.

We saw in the previous experiment that the intake of fructose in an amount of 1 gm. per Kilo body weight causes fructosuria. This does not seem to coincide with the statement of Strauss (1898), Noorden, Folin and Bergland (1922), where fructose is better utilized than glucose by normal subject. As, however, the sugar that appeared in urine in the previous experiment was shown to be fructose by the polarimetric measurement we decided to determine the assimilation limit of some friends who kindly offered themselves for this experiment.

1. The amount of reducing substance in urine excreted during 3 hours in the morning (7-10 a.m.).

Name	Year	Body weight	Urine volume	Reducing subst. in urine (as glucose)
		kg.	cc.	gm.
T. Y.	18	45	106	0.13
S. Y.	31	64	80	0.12
I. H.	27	49	455	0.11
M. A.	31	50	108	0.13

2. The effect of fructose intake on the sugar excretion in the urine.

Amount of Fructose taken		Name of subject	Volume	Urine amount of reducing substant	Polarimetr. reading (1.2 times diluted, tube length = 2 dm.)	Amount of fructose
2 gm. per Kilo	gm. 90	T. Y.	cc. 136	gm. 0.85	-0.75°	gm. 0.67
1.5 per Kilo	73.5 67.5	I. H. T. Y.	647 162	0.52 0.57	-0.09°	0.36
1.0	45	T. Y.	173	0.27		
0.8	36	T. Y.	102	0.23	-0.11°	0.13

0.5	22.5	T. Y.	112	0.13		
	32.0	S. Y.	532	0.15		
	24.5	I. H.	388	0.17		
	25.0	M. A.	116	0.23		
0.3	13.5	T. Y.	198	0.10		
0.2	10.0	M. A.	114	0.16		
	12.8	S. Y.	138	0.15		
0.15	7.5	M. A.	138	0.16		
0.1	5.0	M. A.	143	0.12		

As can be seen in the table, the administration of fructose under 0.5 gm. per Kilo body weight causes no appreciable increase in urine reducing substance. Above 0.8 gm. per Kilo body weight fructosuria is observable. Whether this low tolerance for fructose is limited only to Japanese or is true also for other races is a question that remains quite open.

IX. CONCLUSION.

The results of our experiments can be summarized as follows:

1. In normal dogs the fructosuria is observed when fructose is administered in an amount which does not cause any glucosuria in the case of glucose. This does not mean, however, that tolerance of fructose is lower than that of glucose and is caused only by the lower renal threshold. The degree of hyperglycemia is much lower in fructose than in glucose.

2. In a partly pancreaticised animal A, in which the tolerance has suffered apparently no effect, the administration of fructose in an amount of 2 gm. per Kilo body weight causes fructosuria, while the intake of glucose of the same amount has no effect. Here, too, the fructosuria is due only to the low renal threshold.

3. In slightly diabetic dogs where the tolerance for glucose is much lowered, the intake of fructose in an amount of 2 gm. per Kilo body weight does not cause any fructosuria, while upon the administration in an amount of 3 gm. per Kilo body weight fructose causes only a slight degree of glucosuria. The administration of glucose is answered in this case with the high degree of hyperglycemia and glucosuria.

4. In heavily diabetic animals, where a high degree of hyperglycemia is observed even in the postabsorptive stadium the administration of fructose is accompanied by the heightened elevation of hyperglycemia. The degree of augmentation of blood sugar content is, however, much smaller than when the glucose is administered. The excreted amount of sugar in urine is always smaller in the case of fructose administration than in that of glucose. Fructose is utilized far better than glucose in heavily diabetic dogs.

5. The renal threshold is elevated by the successive administration of fructose. Together with this the degree of hyperglycemia produced by the absorption of fructose becomes augmented.

6. The continual daily administration of neither fructose nor glucose showed any considerable influence on the tolerance for glucose in the case of diabetes levis. The re-excreted amount of glucose injected is less after the continued administration of fructose than after that of glucose.

7. The peroral intake of fructose is tolerated up to 0.5 gm. per Kilo body weight without any extra excretion of sugar in urine. Above 0.8 gm. per Kilo body weight there is fructosuria observable in Japanese.

From these findings it is clear that in the normal condition, where the renal threshold for fructose is quite low, some part of ingested fructose is excreted into urine.

In a diabetic subject, however, the renal threshold is much elevated and fructosuria may disappear in light diabetes, while the digestion of glucose in the same amount causes glucosuria. In a heavily diabetic subject, a considerable amount of ingested fructose is excreted in urine. But the amount of excreted sugar here is considerably less than after the intake of glucose. In the bodies of diabetics, therefore, fructose is always better utilised than glucose. That fructose is much sweeter than cane sugar may add another reason for the recommendation of fructose for the diet of diabetics.

I wish to express my most sincere thanks to Professor S. Kakiuchi for his kind advice and encouragement in carrying out

the investigation. Many thanks are also due to the Tokyo Industrial Laboratory for the free supply of liquid fructose used in this experiment.

REFERENCES.

- Allen, F. M. (1913/1920): Glycosuria and Diabetes. Cambridge. Journ. Exp. Med., **31**, 363, 583; Journ. Biol. Chem., **42**, 415.
Barrenscheen, H. K. (1926): Biochem. Ztschr., **177**, 27, 76.
Benedict, S. R. (1911): Journ. Am. Med. Ass., **57**, 1193.
Bertram, F. (1929): Ztsch. f. ges. exp. Med., **64**, 295.
Brown, C. A. (1906): Journ. Am. Chem. Soc., **28**, 439.
Coles, S. W. (1920): Practical Physiological Chemistry., 6th edit., Cambridge.
Folin, O. and Berglund, H. (1922): Journ. Biol. Chem., **51**, 261.
Hagedorn and Jensen (1923): Biochem. Ztschr., **135**, 46.
Isaac (1920): Med. Klinik, **16**, 1207.
von Noorden, C. (1917): Die Zuckerkrankheit und ihre Behandlung., 7th edit., Berlin.
Pucher, G. W. and Finch, M. W. (1928): Journ. Biol. Chem., **76**, 331.
Strauss, A. (1898): Berl. Klin. Wehnschr., **18**, 398.

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEZIEHUNGEN VERSCHIEDENER ZUCKERARTEN SOWIE ZUCKERBILDENDER SUBSTANZEN ZUM BLUTMILCHSÄURESPIEGEL.

VON

TATSUSABURO KOIKE.

*(Aus dem biochemischen Laboratorium des Präfektur-
Hospitals zu Kobe. Vorstand: Dr. M. Takeda.)*

(Eingegangen am 14. August 1933)

I. EINLEITUNG.

Heute liegt bereits eine grosse Literatur über den Zusammenhang zwischen der Adrenalinhyperglykämie und der Blutmilchsäure vor (Elias und Sammartino, Tolstoi, Cori, Rhu, Ders und Cori, Nakatsuka u.a.m.). Ebenso existieren ziemlich viele Arbeiten über die Beziehungen zwischen verschiedenen Giften resp. Arzneimitteln und dem Blutmilchsäuregehalt (Araki, Morishima, Zillessen, Embden und Isaac, Neubauer u.a.m.).

Der Entstehung dieser Hyperglykämie liegt aber in allen Fällen eine endogene Zuckerbildung zugrunde. Hingegen sind Fälle, in denen sich vielfach eine exogene Entstehung der Hyperglykämie denken lässt, z. B. solche, in welchen der Zusammenhang zwischen der Blutzuckerkurve und dem Blutmilchsäurespiegel nach Verabreichung von Zucker beobachtet worden ist, bisher nur wenig berichtet worden. So haben Wierzuchowski und Laniewski (1931) an Hunden eine Dauerinfusion von Glukose vorgenommen und beobachtet, dass es bei gleichzeitigem Anstieg des Milchsäurespiegels im Blut Abnahme der Alkalireserve kommt. Auch Collazo und Supuiewski (1925) haben eine Erhöhung des Milchsäurewertes im Blut nach Glukoseinjektion, Yamada (1932) dieselbe bei Hunden nach der Injektion von Glukose, Fruktose und Arabinose beobachtet.

Über das Verhalten der zuckerbildenden Substanzen zum Blut-

milchsäurespiegel, wie etwa Sorbit und Glyzerin, die übrigens im Organismus in Zucker umgewandelt werden dürften, liegen unseres Wissens nach bis jetzt noch keine genauen Untersuchungen vor.

Baldes, Schmidt und Embden haben über den Einfluss der Verabreichung von Zuckerspaltprodukten oder zuckerbildenden Substanzen auf den Milchsäurespiegel Tierversuche angestellt und fanden, dass bei der Durchblutung der Leber mit Dioxyazeton Milchsäure zum Vorschein kommt. Schneider und Widmann (1929) injizierten Kaninchen Methylglyoxal und Dioxyaceton intravenös und machten Bestimmungen des Blutzuckers, der Milchsäure und der Alkalireserve; doch konnten sie nur im ersteren Falle eine Erhöhung des Milchsäurespiegels feststellen.

Stöhr hat an die Versuchstiere Dioxyazeton, Glyzerinaldehyd, Methylglyoxal und Glukose verfüttert und fand dabei, dass bei der Verabreichung der letzteren Agentia eine Abnahme der Alkalireserve im Blut verursacht wird, während die Verabreichung des Dioxyazeton darauf keinerlei Einfluss ausübt. Stöhr ist der Ansicht, dass die Umwandlung des Dioxyazetons im Gegensatz zu der des Methylglyoxals, des Glyzerinaldehyds und der Glukose nicht in die intermediäre Säurestufe (Milchsäure) erfolge.

Meine Versuche sind von dem Gedanken ausgegangen, dass es interessant sein müsse, die Verschiedenheiten in den biologischen Eigenschaften der Zuckerarten, falls solche vorhanden, bei der parenteralen Verabreichung derselben bei Versuchstieren, und zwar den Milchsäurespiegel im Blut einerseits und die Beziehung desselben zum Blutreduktionswerte andererseits, festzustellen. Ich habe zu diesem Zwecke verschiedene Zuckerarten (Glukose, Fruktose, Mannose, Galaktose, Maltose, Laktose, Arabinose und Xylose) Kaninchen intraperitoneal injiziert und darauf den Zusammenhang zwischen der Blutzuckerkurve und dem Milchsäurespiegel im Blut genau beobachtet.

Über die Zuckerbildung auf Kosten des Glyzerins sind bereits verschiedene Forschungsergebnisse bekannt (Cremer, Lüthje, Satta und Beit, Lang und Bischem, McCann, Thomas, Voegtlin, Dunn und Thompson, Takeda u. a.). Auch der Verf. hat sich 1933 experimentell mit diesem Thema befasst und

die Resultate veröffentlicht. Da es aber bis dahin noch unklar blieb, ob das Glycerin im Organismus bei der Zuckerbildung intermediär Milchsäure bilden könne, und wenn, in welchem Umfange das geschehen könne, auch die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der möglichen Milchsäurebildung und der Zuckerbildung bis jetzt noch unberücksichtigt blieb, hat Verf. nun genaue vergleichende Untersuchungen über den Einfluss des Glycerins auf den Blutreduktionswert und den Blutmilchsäurewert angestellt.

Was die Beziehungen zwischen Sorbit und Zuckerbildung angeht, so fehlt es nicht an wertvollen Arbeiten (Thannhauser und Meyer, Freise und Walenta, Kaufmann, Sawada, Koike u. a. m.), doch schien es mir angezeigt, auch bzgl. des Sorbits ähnliche Versuche wie oben anzustellen.

Weiter habe ich noch Versuche angestellt um festzustellen, wie sich die Hyperglykämie und der Blutmilchsäurespiegel bei Injektion von Natrium lacticum oder Adrenalin zu einander verhalten, und die erhaltenen Ergebnisse mit den im Falle der Injektion von Glycerin und Sorbit erhaltenen verglichen.

II. EXPERIMENTELLES.

Als Versuchstiere dienten uns in der überwiegenden Mehrzahl männliche Kaninchen, die sämtlich fast über 2 kg schwer waren und über 12 Stunden lang gefungert hatten. Sie wurden täglich mit einer bestimmten Nahrung gefüttert. Und die Blutentnahme erfolgte so sorgfältig, dass keine Aufregung der Tiere auftrat.

Die Injektion der Zuckerarten oder zuckerbildenden Substanzen erfolgte intraperitoneal. Dies geschah mit Rücksicht auf die Ergebnisse von Sawada (1933), nach denen klar ist, dass durch die intraperitoneale Injektion der Hinweis auf den Staub-Effekt und die hypoglykämische Phase nach der Belastung auffallend deutlich ist.

Die Bestimmung der Blutmilchsäure geschah nach der Methode von Mendel und Goldscheider, die des Blutreduktionswertes nach Hagedorn-Jensen. Bei der originalen Methode der Blutenteiweissung von Mendel und Goldscheider wird 5%ige Metaphosphorsäure angewendet, ich habe es vorgezogen, diese in

10%iger Verdünnung zu benützen.

1. *Normaler Milchsäurewert im Blut
des Kaninchens.*

Wir besitzen bereits zahlreiche Mitteilungen über den normalen Milchsäurewert im Blut von Kaninchen, die ich hier kurz zusammenfassend wiedergebe:

TABELLE I.

Autor.	Jahr d. Veröff.	Normaler Milchsäurewert i. Kaninchenblute.
S. W. Clausen	1922	77.00 mg %
R. Rhu	1924	129.00 mg %
F. Valentin	1925	101.00 mg %
Carl F. Cori	1925	23.00 mg %
Stuber u. Lang	1926	17.00 mg %
Katayama u. J. A. Kilian	1926	18.00 mg %
Kawamura	1928	♂ 20.20 mg %
Dsbe.	1928	♀ 23.80 mg %
Noshi	1929	8.40 mg %
Kinoshita	1931	13.77 mg %

Nach meinen Untersuchungen in 46 Fällen gesunder Kaninchen, die absolut ruhig gehalten worden waren, ergab sich der Milchsäurewert im Blut wie in Tabelle angegeben.

Demnach betrug also bei meinen Untersuchungen der Maximalwert für den Blutmilchsäuregehalt 14.65 mg%, der Minimalwert 9.09 mg% und der Durchschnittswert 9.86 mg%.

2. *Schwankungen in Blutmilchsäuregehalt
bei Kaninchen.*

Es ist bereits von Hill und Long (1925) sowie auch von Mendel, Engel und Goldscheider (1925) u. a. m. festgestellt worden, dass der Blutmilchsäurewert durch die Muskelkontraktion eine Erhöhung erfährt. Verf. hat diese Untersuchungen wiederholt und, wie die Tabelle III zeigt, gefunden, dass, wenn das Tier

TABELLE II.

Nr.	Körper- gewicht (kg)	Milch- säure (mg%)	Blut- zucker (mg%)	Nr.	Körper- gewicht (kg)	Milch- säure (mg%)	Blut- zucker (mg %)
1	♂ 2.320	9.47	101.6	2	♂ 1.870	9.57	75.4
3	♂ 1.900	14.65	116.0	4	♂ 1.900	10.23	113.0
5	♂ 1.920	10.23	84.0	6	♂ 2.400	9.78	99.2
7	♂ 2.360	9.68	98.1	8	♀ 2.390	10.34	121.2
9	♀ 2.230	10.52	109.8	10	♂ 1.900	9.88	95.0
11	♂ 1.920	10.39	91.8	12	♂ 1.900	10.34	85.0
13	♂ 1.900	10.46	99.5	14	♂ 2.010	9.89	99.0
15	♀ 2.900	9.23	96.8	16	♀ 2.160	9.47	89.5
17	♂ 2.360	9.38	95.2	18	♂ 2.220	9.89	81.0
19	♂ 2.100	9.57	92.0	20	♂ 2.100	10.00	90.0
21	♀ 2.360	9.57	92.2	22	♂ 2.030	9.57	94.8
23	♂ 2.500	9.67	108.0	24	♂ 2.000	10.00	106.6
25	♂ 2.000	10.23	99.8	26	♂ 2.220	9.47	119.5
27	♂ 2.020	9.38	98.0	28	♂ 1.900	9.78	81.4
29	♂ 2.160	9.67	92.2	30	♂ 2.460	9.57	90.0
31	♂ 2.220	9.78	83.0	32	♂ 2.460	9.89	99.1
33	♂ 2.130	9.47	100.1	34	♂ 2.250	9.67	84.8
35	♂ 2.465	9.67	75.3	36	♂ 1.780	9.57	73.3
37	♂ 2.020	9.23	101.0	38	♂ 1.610	10.23	95.6
39	♂ 1.720	9.47	91.2	40	♂ 2.330	9.47	78.9
41	♂ 2.090	9.18	100.9	42	♂ 1.960	9.67	90.5
43	♂ 2.290	9.09	83.0	44	♂ 2.115	9.78	96.6
45	♂ 1.960	9.67	90.5	46	♂ 1.900	9.67	93.6

aus dem Käfig freigelassen wird und sich einige Minuten lang bewegt, ein mehr oder weniger deutlicher Anstieg im Blutmilchsäuregehalt einsetzt, um dann in 30 Minuten dem Normalwert wieder ziemlich nahe zu kommen. Im Blutzuckerwert war aber keinerlei Veränderung festzustellen. Auf Grund dieser Erfahrung habe ich die Bestimmung des normalen Blutmilchsäuregehaltes immer dann vorgenommen, wenn die Tiere 30 Minuten aus dem Käfig genommen und während dieser Zeit vollständig ruhig gehalten worden waren.

TABELLE III.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 47 ♂ (1.900 kg)		Nr. 48 ♂ (1.920 kg)		Nr. 49 ♂ (1.900 kg)	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
freigelassen a. d. Käfig	Sofort	40.28	120.0	28.35	113.8	40.54	102.0
	30 min.	30.39	116.0	10.23	111.6	19.52	88.0
Nach dem Gehen	Sofort	30.39	117.0	20.00	121.0	40.00	102.0
	30 Min.	19.76	121.0	10.34	117.0	19.29	86.0
	60 Min.	14.65	116.0	10.23	113.0	10.23	88.0
	90 Min.	15.88	115.0	10.23	113.0		
	2 St.					10.23	84.0
	3 St.					10.00	81.0

3. Über den Einfluss der Infusion von physiologischer
Kochsalzlösung auf den Blutmilchsäurespiegel.

Um den Einfluss der Infusion verschiedener Lösungen auf den Blutmilchsäurespiegel festzustellen, habe ich physiologische Kochsalzlösung in der gleichen Menge wie der zu injizierende Zucker dem Kaninchen intraperitoneal injiziert und darauf den Blutmilchsäurewert festgestellt. Wie Tabelle IV zeigt, ergab sich dabei eine leichte Zunahme. Aus diesem Grunde habe ich bei

TABELLE IV.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 50 ♂ (2.600 kg)		Nr. 51 ♂ (2.520 kg)		Nr. 52 ♂ (2.040 kg)	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.23	93.9	9.38	84.2	9.78	92.6
Nach der Injektion	1/2 St.	19.29	101.4	20.00	98.3	10.34	101.6
	1 St.	9.09	93.5	9.47	84.2	10.00	102.4
	2 St.	9.38	98.1	9.47	83.0	9.57	28.2
	3 St.	9.23	98.2	9.57	83.6	9.78	92.5
	4 St.	9.23	98.6	9.67	84.0	9.78	92.8
	5 St.	9.09	98.2	9.47	84.5	9.89	92.5

allen weiteren Untersuchungen mit den verschiedenen Zuckerlösungen, in denen sich eine Zunahme bis zu 20 mg% 30 Minuten nach Injektion einstellte, diese auf den Einfluss der Infusion zurückgeführt.

III. VERSUCHSERGEBNISSE.

Verf. hat verschiedene Zuckerarten (Glukose, Fruktose, Mannose, Galaktose, Maltose, Laktose, Arabinose und Xylose) sowie auch zuckerbildende Substanzen (Sorbit, Glycerin, Laktat und Adrenalin) dem Kaninchen intraperitoneal injiziert und darauf zu verschiedenen Zeiten zugleich mit dem Blutzucker auch die Blutmilchsäure bestimmt. Die Kurven der erhaltenen beiden Werte wurden dann miteinander verglichen, wodurch sich die nachstehenden Resultate ergaben:

A. Verschiedene Zuckerarten.

1. *Glukose.*

Die Beobachtungen über den Blutmilchsäure- und Blutzuckerwert nach der intraperitonealen Injektion von Glukose sind aus der Tabelle V zu ersehen. Es geht daraus hervor, dass die Werte für die Blutmilchsäure ebenso wie für den Blutzucker 30 Minuten nach der Glukoseinjektion beide einen Kurvengipfel erreichen. Selten erreicht der Blutmilchsäurewert diesen Gipfel erst 1 Stunde p. Inj., und in solchen Fällen erreicht auch der Blutzuckerwert erst zu diesem Zeitpunkte den Kurvengipfel. Im allgemeinen verläuft der Milchsäurewert parallel, mit dem Blutzuckerwert, und die Kurvengipfel beider Werte decken sich fast genau.

In der Mehrzahl der Fälle kehrt der Blutmilchsäurewert innerhalb 2 Stunden p. Inj. zur Norm zurück, und dabei liegt der Blutzuckerwert dann unter 200 mg%; d. h. eine Erhöhung des Blutmilchsäurespiegels ist bei einem Blutzuckerwert von über 200 mg% zu beobachten, nicht aber wenn dieser darunter liegt.

2. *Fruktose.*

Ebenso wie im Falle der Glukose stimmen auch bei der Fruktose die Kurvengipfel für den Blutmilchsäurewert und den

TABELLE V.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 53 ♂ (2.220 kg)		Nr. 54 ♂ (2.100 kg)		Nr. 56 ♀ (2.360 kg)		Nr. 57 ♂ (2.160 kg)	
Intraperitoneale Injektion		5 % Glukose pro kilo 20.0 ccm		5 % Glukose pro kilo 20.0 ccm		10 % Glukose pro kilo 20.0 ccm		15 % Glukose pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.28	104.0	9.89	81.0	9.39	103.8	9.38	92.0
Nach der Injektion	1/2 St.	24.60	186.0	25.00	199.5	35.00	235.4	51.49	318.4
	1 St.	15.21	164.8	20.25	194.6	30.50	230.6	39.47	282.4
	2 St.	9.87	109.4	9.89	93.8	9.17	171.2	19.07	206.3
	3 St.	10.00	104.2	9.78	86.5	8.59	122.4	9.47	130.5
	4 St.	9.87	97.2	9.67	73.8	9.06	108.0	9.18	90.0
	5 St.	9.75	93.8	9.89	73.8	8.95	100.4	9.18	82.8
	8 St.			9.78	70.2			9.09	86.2
	24 St.			9.89	80.5			9.47	90.5

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 58 ♂ (1.730 kg)		Nr. 59 ♂ (2.030 kg)		Nr. 60 ♂ (2.500 kg)		Nr. 62 ♂ (2.000 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Glukose pro kilo 20.0 ccm		15 % Glukose pro kilo 20.0 ccm		15 % Glukose pro kilo 20.0 ccm		15 % Glukose pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.57	101.5	9.57	94.8	9.67	108.0	10.23	99.8
Nach der Injektion	1/2 St.	59.04	288.0	59.62	275.0	59.04	309.9	41.11	247.3
	1 St.	29.62	239.2	60.00	326.7	40.00	307.8	20.00	208.8
	2 St.	10.34	165.6	20.25	280.6	10.34	179.6	9.89	131.8
	3 St.	10.23	123.2	19.76	234.4	10.11	105.2	10.11	101.5
	4 St.	10.00	95.4	9.67	180.8	9.89	100.4	9.89	95.2
	5 St.	9.38	85.8	10.23	89.8	9.67	102.6	10.00	96.6
	8 St.	9.18	87.3	9.78	90.7	9.57	105.5	10.00	98.7
	24 St.	9.38	99.8	9.47	90.3	9.47	107.0	9.78	100.2

Blutzuckerwert in auffallendem Masse überein. 30 Minuten nach der Fruktose-Injektion erreichen beide Werte den Gipfel.

Der Anstieg des Blutmilchsäurespiegels bei 1–3 g pro kilo Fruktoseinjektion dauert nicht über 1 Stunde an, bei 4 g pro kilo Fruktoseinjektion dauert er 2 Stunden an, doch nicht darüber hinaus. Im allgemeinen dauert die Hyperglykämie 3 Stunden an; nach 4 oder 5 Stunden tritt ebenso wie nach der Glukoseinjektion Hypoglykämie auf.

3. *Mannose.*

Ebenso wie bei den Glukose- und Fruktose-Versuchen fällt auch bei den Mannose-Versuchen der Kurvengipfel des Blutmilchsäure- mit dem des Blutzuckerwertes zusammen. 30 Minuten nach der Mannoseinjektion erreichen beide Werte den Gipfel der Kurve. Im allgemeinen dauert die Zunahme des Milchsäurespiegels nicht länger als 1 Stunde nach der Mannoseinjektion an, die Hyperglykämie dagegen etwa 4 Stunden. Ebenso wie bei der Fruktose und Glukose ist auch im Falle der Mannose in der Mehrzahl der Fälle bei einem Blutzuckerwert von unter 200 mg% ein erhöhter Blutmilchsäurewert nicht zu beobachten. Die betreffs der Mannose erzielten Versuchsergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

4. *Galaktose.*

Die Kurvengipfel für die Blutmilchsäure- und Blutzuckerwerte fallen auch hier zusammen, und zwar wird der Gipfel 30 Minuten nach der Galaktoseinjektion erreicht.

Der Milchsäureanstieg im Blut dauert nicht länger als 1 Stunde nach der Galaktoseinjektion an; der Reduktionswert des Blutes erreicht auch 5 Stunden nach der Galaktoseinjektion den normalen Wert noch nicht wieder; d. h. es ist in diesem Falle die hypoglykämische Reaktion nach der Zuckerbelastung nicht nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle VIII wiedergegeben.

5. *Maltose.*

Der Kurvengipfel des Blutmilchsäurewertes fällt mit dem

Tabelle VI.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 63 ♂ (1.780 kg)		Nr. 65 ♂ (2.270 kg)		Nr. 66 ♂ (2.160 kg)		Nr. 68 ♂ (1.800 kg)	
Intraperitoneale Injektion		5 % Fruktose pro kilo 20.0 cem		10 % Fruktose pro kilo 20.0 cem		10 % Fruktose pro kilo 20.0 cem		15 % Fruktose pro kilo 20.0 cem	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.89	109.2	9.87	108.2	9.67	92.2	9.38	93.6
Nach der Injektion	1/2 St.	18.85	185.2	25.00	297.0	30.38	230.4	49.28	254.6
	1 St.	10.00	142.4	19.41	255.4	29.62	227.4	20.50	230.4
	2 St.	9.39	127.4	9.28	144.0	10.34	169.4	10.29	139.5
	3 St.	9.17	111.2	9.50	121.2	9.87	143.0	10.00	98.2
	4 St.	9.62	102.4	9.28	109.0	9.47	96.0	9.23	92.0
	5 St.	9.50	98.2	9.39	104.2	9.57	82.0	9.18	89.2
	8 St.					9.38	90.5	9.18	91.5
	24 St.					9.67	92.6	9.57	93.5
Nummer (Körpergewicht)		Nr. 69 ♂ (1.860 kg)		Nr. 70 ♂ (2.220 kg)		Nr. 71 ♂ (2.460 kg)		Nr. 74 ♂ (1.780 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Fruktose pro kilo 20.0 cem.		15 % Fruktose pro kilo 20.0 cem		15 % Fruktose pro kilo 20.0 cem		20 % Fruktose pro kilo 20.0 cem	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.57	101.5	9.78	83.0	9.67	99.1	9.67	95.3
Nach der Injektion	1/2 St.	51.49	239.8	52.27	268.0	38.95	246.5	59.04	306.5
	1 St.	41.11	194.2	40.64	255.2	20.50	215.6	40.64	283.0
	2 St.	10.23	158.4	19.07	196.0	10.23	146.7	29.62	201.0
	3 St.	10.00	122.2	10.00	102.8	9.89	130.0	9.78	124.3
	4 St.	9.23	98.8	9.57	96.0	9.57	121.0	9.78	69.4
	5 St.	9.18	85.6	9.67	81.2	9.67	96.0	9.67	78.9
	8 St.	9.23	90.5	9.67	82.5	9.67	98.0	9.47	70.5
	24 St.	9.38	96.4	9.67	84.2	9.78	99.8	9.57	73.2

TABELLE VII.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 75 ♂ (1.820 kg)		Nr. 76 ♂ (1.700 kg)		Nr. 77 ♂ (1.920 kg)	
Intraperitoneale Injektion		10 % Mannose pro kilo 20.0 cem		15 % Mannose pro kilo 20.0 cem		15 % Mannose pro kilo 20.0 cem	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.57	120.6	9.89	95.4	9.38	108.8
Nach der Injektion	1/2 St.	20.25	181.6	58.73	298.6	39.47	284.4
	1 St.	9.89	156.8	30.00	293.8	29.29	250.2
	2 St.	9.67	132.2	10.23	194.6	10.00	177.2
	3 St.	9.47	113.9	10.34	142.4	9.18	143.1
	4 St.	9.23	109.0	10.11	112.8	9.09	115.8
	5 St.	9.57	98.2	10.00	84.5	9.09	98.5

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 78 ♂ (1.950 kg)		Nr. 79 ♂ (2.120 kg)		Nr. 80 ♂ (1.840 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Mannose pro kilo 20.0 cem		15 % Monnose pro kilo 20.0 cem		15 % Mannose pro kilo 20.0 cem	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.57	117.8	10.00	81.9	9.38	102.2
Nach der Injektion	1/2 St.	38.38	306.4	29.47	263.5	41.11	263.6
	1 St.	19.34	256.8	19.79	246.1	19.52	224.5
	2 St.	10.00	173.6	9.78	131.1	10.23	152.2
	3 St.	9.57	136.0	9.78	107.9	10.00	121.6
	4 St.	9.47	134.4	9.18	82.1	9.23	100.5
	5 St.	9.38	94.4	9.18	70.1	9.09	91.0

Kurvengipfel des Blutzuckerwertes weitgehend zusammen. Die beiden Werte erreichen innerhalb 30 Minuten nach der Maltoseinjektion den Kurvengipfel.

Die Dauer der Steigerung des Blutmilchsäurewertes erstreckt sich nur auf 1-2 Stunden nach der Maltoseinjektion, während der

TABELLE VIII.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 81 ♂ (1.800 kg)		Nr. 82 ♂ (1.830 kg)		Nr. 83 ♂ (1.820 kg)	
Intraperitoneale Injektion		10 % Galaktose pro kilo 20.0 ccm		10 % Galaktose pro kilo 20.0 ccm		15 % Galaktose pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.09	120.0	9.78	95.6	9.78	75.6
Nach der Injektion	1/2 St.	20.25	264.8	40.00	242.5	51.53	256.2
	1 St.	19.29	263.0	19.76	230.1	39.47	216.1
	2 St.	10.23	209.0	10.11	200.6	20.00	200.0
	3 St.	10.11	173.2	9.78	162.1	10.34	176.4
	4 St.	9.78	141.2	9.57	130.0	9.78	163.4
	5 St.	9.47	130.0	9.38	106.4	9.57	126.5

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 84 ♂ (2.060 kg)		Nr. 84 ♂ (2.010 kg)		Nr. 86 ♀ (2.150 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Galaktose pro kilo 20.0 ccm		15 % Galaktose pro kilo 20.0 ccm		15 % Galaktose pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		10.11	107.3	10.23	101.2	10.23	101.3
Nach der Injektion	1/2 St.	51.49	248.9	57.23	281.2	41.11	269.5
	1 St.	29.62	242.3	40.00	237.8	19.29	230.6
	2 St.	19.29	210.1	20.00	182.0	19.07	195.5
	3 St.	10.11	149.5	10.34	167.2	10.34	152.2
	4 St.	9.78	119.5	9.67	148.8	10.00	131.0
	5 St.	9.38	115.3	9.57	119.8	9.67	118.2

Anstieg des Blutreduktionswertes bis zu 4-5 Stunden nach der Maltoseinjektion anhält. Der Blutmilchsäurewert kehrt ferner meist schon zu der Zeit zur Norm zurück, wo der Blutreduktionswert sich noch um 200 mg% bewegt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle IX wiedergegeben:

6. *Laktose.*

Nach der Laktoseinjektion steigt der Blutreduktionswert ebensoschnell an wie bei den anderen bisher genannten Zuckerarten; danach tritt dann zwar ein allmähliches Abklingen ein, eine hypoglykämische Reaktion nach der Zuckerbelastung wie bei der Glukose und Fruktose ist aber hier nicht zu beobachten.

Trotz dieses starken Anstiegs des Blutreduktionswertes ist dieser nicht von einer Erhöhung des Blutmilchsäurewertes begleitet. Es scheint, dass auf die intraperitoneale Injektion von Laktose im Blutmilchsäurespiegel keine weitere Veränderung eintritt.

7. *Xylose und Arabinose.*

Im Gegensatz zu dem Anstieg des Blutreduktionswertes ist nach der Injektion von Xylose oder Arabinose die Zunahme des Blutmilchsäureswertes unbedeutend.

Selbst bei Injektion von Xylose und Arabinose zusammen ist noch 5 Stunden p. Inj. keine hypoglykämische Phase nachweisbar.

B. Zuckerbildende Substanzen.

1. *Glyzerin.*

Dass die Verabreichung von Glyzerin beim Tiere Hyperglykämie zur Folge hat, ist schon vielfach beobachtet worden (Voegtlin, Dunn, Thompson, Takeda, Koike u. a.). Bezüglich des dabei in Erscheinung tretenden Blutmilchsäurespiegels ist dagegen bisher noch gar nichts bekannt.

Verf. hat aber gefunden, dass die Kurvengipfel des Blutmilchsäurewertes und Blutzuckerwertes nach der intraperitonealen Injektion von Glyzerin in Kaninchen in den meisten Fällen übereinstimmt; nur in einzelnen Fällen war eine Abweichung zu beobachten.

Der Blutreduktionswert erreicht meist 2 Stunden nach der Glyzerininjektion den Kurvengipfel, in einigen Fällen wird dieser Gipfel aber auch erst nach 3 Stunden erreicht. Der Blutmilchsäurewert erreicht den Höhepunkt in den meisten Fällen 2 Stunden

TABELLE IX.

Nummer (Körperge- wicht)	Nr. 87 ♂ (2.030 kg)		Nr. 88 ♂ (1.950 kg)		Nr. 89 ♂ (2.070 kg)		Nr. 90 ♂ (2.310 kg)		Nr. 91 ♀ (2.130 kg)	
	15 % Maltose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker	15 % Maltose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker	15 % Maltose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker	15 % Maltose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker	15 % Maltose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker
Intraperi- toneale Injektion										
mg %	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion	9.47	112.4	10.23	111.2	9.78	106.7	9.67	89.4	9.67	111.8
Nach der Injektion	1/2 St.									
	1 St.	39.47	67.76	259.2	62.00	244.4	49.28	232.0	48.59	292.8
	2 St.	30.00	50.00	220.9	41.11	222.2	30.00	213.8	20.00	289.6
	3 St.	10.34	20.50	180.8	30.00	209.1	10.34	212.8	10.34	249.4
	4 St.	10.00	10.34	170.8	10.00	195.6	10.23	195.6	10.23	219.0
	5 St.	9.78	10.23	124.6	9.23	133.2	9.38	136.0	9.89	200.6
		9.67	10.00	100.4	10.00	126.2	9.23	110.4	9.67	125.8

TABELLE X.

Nummer (Körperge- wicht)	Nr. 92 ♂ (1.950 kg)		Nr. 93 ♂ (2.010 kg)		Nr. 94 ♂ (1.720 kg)		Nr. 95 ♀ (2.410 kg)		Nr. 96 ♂ (1.900 kg)	
	15 % Laktose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker	15 % Laktose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker	15 % Laktose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker	15 % Laktose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker	20 % Laktose pro kilo 20.0 cem	Blut- zucker
Intraperi- toneale Injektion	10.34	110.6	10.00	90.2	10.23	78.7	10.23	104.4	10.23	111.6
mg %	10.34	110.6	10.00	90.2	10.23	78.7	10.23	104.4	10.23	111.6
Vor der Injektion	10.34	176.9	10.00	167.0	20.00	175.1	20.00	158.0	20.00	283.2
1/2 St.	10.34	170.1	9.78	165.0	9.89	175.1	9.78	221.0	10.23	300.5
1 St.	10.11	153.9	9.67	132.4	10.23	232.8	9.89	194.2	9.47	244.4
2 St.	10.23	150.6	9.67	98.9	10.34	216.2	9.78	186.2	9.47	201.5
3 St.	14.07	148.9	9.67	95.2	14.07	199.1	10.34	164.1	9.57	180.0
4 St.	10.11	126.9	9.78	97.4	10.00	162.0	10.00	130.7	9.38	161.2
5 St.	10.11	126.9	9.78	97.4	10.00	162.0	10.00	130.7	9.38	161.2
Nach der Injektion	10.11	126.9	9.78	97.4	10.00	162.0	10.00	130.7	9.38	161.2

TABELLE XI.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 97 ♀ (1.750 kg)		Nr. 98 ♂ (2.070 kg)		Nr. 99 ♂ (1.950 kg)		Nr. 100 ♂ (2.050 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Xylose pro kilo 20.0 ccm		15 % Xylose pro kilo 20.0 ccm		15 % Xylose pro kilo 20.0 ccm		15 % Xylose pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.57	92.0	10.00	99.0	9.38	89.2	10.23	90.5
Nach der Injektion	1/2 St.	20.59	202.6	30.00	275.0	20.38	262.8	19.62	209.9
	1 St.	9.78	189.0	10.23	221.7	19.07	231.8	10.34	192.6
	2 St.	9.78	136.0	10.23	189.4	9.89	182.1	10.23	154.2
	3 St.	9.78	113.6	10.23	170.6	9.57	135.4	9.89	128.8
	4 St.	9.47	102.2	10.23	148.8	9.47	125.4	9.57	121.0
	5 St.	9.57	98.5	9.78	119.6	9.23	110.2	9.47	120.0

TABELLE XII.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 101 ♂ (1.860 kg)		Nr. 102 ♂ (1.820 kg)		Nr. 103 ♂ (1.950 kg)		Nr. 104 ♀ (1.920 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Arabi- nose pro kilo 20.0 ccm		15 % Arabi- nose pro kilo 20.0 ccm		15 % Arabi- nose pro kilo 20.0 ccm		15 % Arabi- nose pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.23	77.2	9.47	77.2	9.89	99.3	10.00	92.6
Nach der Injektion	1/2 St.	20.00	283.6	20.38	244.0	29.62	295.3	20.50	251.5
	1 St.	10.23	275.6	10.52	259.8	9.89	228.9	10.59	220.0
	2 St.	9.78	241.8	10.29	234.4	10.00	190.3	10.23	189.9
	3 St.	10.23	226.4	10.00	209.6	9.47	169.7	9.67	170.2
	4 St.	9.47	160.6	10.23	143.5	9.78	138.9	9.78	139.6
	5 St.	9.67	108.9	9.47	109.5	9.67	118.4	9.89	120.3

nach der Glyzerininjektion, in einigen wenigen Fällen aber wird dieser Höhepunkt schon nach 1 Stunde erreicht, in anderen wieder erst nach 3 Stunden.

Wenn der Blutreduktionswert nach der Glycerininjektion nach anfänglichem Anstieg wieder abfällt, so ist in der Mehrzahl der Fälle, auch wenn der Blutreduktionswert unter 200 mg% fällt, der Blutmilchsäurewert noch übernormal hoch. Im allgemeinen verlaufen zwar die Kurven des Blutmilchsäure- und des Blutreduktionswertes einander parallel, wenn aber die Hyperglykämie abnorm lange andauert, dann dauert auch der Blutmilchsäureanstieg lange an.

In einigen wenigen Fällen ist noch 8 Stunden nach der Injektion ein erhöhter Blutmilchsäurespiegel zu beobachten, meist aber hält der Anstieg nur 4 Stunden an. Die Hyperglykämie dauert aber in der Mehrzahl der Fälle bis zu 8 Stunden p. Inj.

, 2. Sorbit.

Zuerst hat Kaufmann an Tiere Sorbit (Sionon) verabreicht und dabei einen Anstieg des Blutreduktionswertes beobachtet. Dann hat auch Sawada (1930) an Tiere Sorbit verabreicht und den Anstieg des Blutreduktionswertes beobachtet. Sawada erbrachte den experimentellen Nachweis dafür, dass dieser Anstieg auf einer Zunahme des Gärungszuckers im Blute beruht und nicht auf einer Mobilisation des Glykogens im Tierkörper, und dass das Sorbit zur Beseitigung des hypoglykämischen Komplexes gut wirksam ist; weiter fand er auch, dass im Tierkörper Sorbit in Glykogen überführt und in den Organen und Muskeln aufgespeichert wird.

Ich habe an Phlorhizintieren experimentell nachweisen können, dass der nach Sorbitgaben im Harn auftretende Zucker aus Extrastickstoffverbindungen stammt und habe nun festzustellen gesucht, welche Veränderungen im Blutmilchsäurespiegel nach der Verabreichung von Sorbit auftreten. Dabei habe ich gefunden, dass im allgemeinen die Kurven für den Blutmilchsäure- und den Blutzuckerwert einander parallel verlaufen und ihre Kurvengipfel zusammenfallen.

Diese Kurvengipfel wurden meist 1 Stunde nach der Sorbitinjektion erreicht, es kamen aber auch einzelne Fälle vor, in denen das schon nach 30 Minuten der Fall war. Die Vermehrung der

TABELLE XIII.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 105 ♂ (1.900 kg)		Nr. 106 ♂ (1.920 kg)		Nr. 107 ♂ (1.900 kg)		Nr. 108 ♂ (1.900 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Glycerin pro kilo 20.0 ccm		15 % Glycerin pro kilo 20.0 ccm		15 % Glycerin pro kilo 20.0 ccm		15 % Glycerin pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.88	95.0	10.39	91.8	10.34	85.0	10.46	99.5
Nach der Injektion	1 St.	50.62	251.0	41.91	132.6	59.04	228.8	39.47	209.1
	2 St.	53.25	305.6	40.00	169.7	62.00	330.2	48.59	213.1
	3 St.	55.40	363.0	35.73	197.2	59.99	322.6	30.00	246.1
	4 St.	Existus unter Krämpfen.		10.00	133.6	20.00	313.6	30.50	263.3
	5 St.			9.46	133.3	19.52	260.2	30.38	239.5
	8 St.			10.39	121.0	20.00	159.1	20.00	159.6
	24 St.			9.62	96.0	10.23	85.1	10.34	97.0
Nummer (Körpergewicht)		Nr. 109 ♀ (2.450 kg)		Nr. 110 ♂ (2.010 kg)		Nr. 111 ♂ (2.400 kg)		Nr. 112 ♂ (2.390 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Glycerin pro kilo 20.0 ccm		15 % Glycerin pro kilo 20.0 ccm		15 % Glycerin pro kilo 20.0 ccm		15 % Glycerin pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.23	96.8	9.89	99.0	9.78	96.2	10.23	121.2
Nach der Injektion	1 St.	19.76	198.6	20.00	117.4	48.59	145.7	62.00	298.2
	2 St.	48.59	231.8	48.59	223.0	50.38	237.6	58.59	333.2
	3 St.	51.47	269.8	39.52	153.0	30.00	226.2	41.11	278.2
	4 St.	30.00	240.0	30.38	125.0	19.52	133.2	20.00	232.8
	5 St.	10.11	169.5	20.00	123.4	10.00	116.3	10.34	158.6
	8 St.	9.78	98.2	9.67	96.2	9.67	112.1	10.46	97.4
	24 St.	9.47	95.9	9.57	92.4	9.38	93.0	10.23	108.0

Milchsäure im Blut dauerte meist 2-3 Stunden nach der Sorbitinjektion an, während die Hyperglykämie gewöhnlich 3-4 Stunden andauert. Bei den Versuchen mit Hexosen und mit Maltose haben

TABELLE XIV.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 115 ♂ (2.190 kg)		Nr. 116 ♂ (2.320 kg)		Nr. 117 ♂ (1.870 kg)	
Intraperitoneale Injektion		10 % Sorbit pro kilo 20.0 ccm		15 % Sorbit pro kilo 20.0 ccm		15 % Sorbit pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.47	102.5	9.47	101.6	9.57	75.4
Nach der Injektion	1/2 St.	39.49	206.0	51.49	231.6	39.27	200.2
	1 St.	20.25	174.2	30.00	213.0	40.64	200.6
	2 St.	10.23	131.5	19.29	171.4	20.25	127.8
	3 St.	9.47	105.5	10.00	118.4	10.23	104.2
	4 St.	9.38	102.7	9.23	108.9	9.67	83.0
	5 St.	9.23	100.5	9.47	98.8	9.38	75.8

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 118 ♂ (1.950 kg)		Nr. 119 ♂ (1.830 kg)		Nr. 121 ♂ (1.950 kg)	
Intraperitoneale Injektion		15 % Sorbit pro kilo 20.0 ccm		15 % Sorbit pro kilo 20.0 ccm		20 % Sorbit pro kilo 20.0 ccm	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		10.23	101.3	10.34	91.8	10.34	97.6
Nach der Injektion	1/2 St.	60.00	232.2	59.04	207.0	52.27	271.5
	1 St.	62.00	253.2	52.27	205.0	58.13	296.7
	2 St.	20.00	174.0	29.62	109.8	41.11	200.2
	3 St.	10.00	115.4	19.29	102.8	30.38	162.5
	4 St.	10.23	119.7	9.78	90.4	10.34	118.6
	5 St.	9.47	89.4	9.57	84.4	10.23	95.5

wir gesehen, dass wenn der Blutzuckerwert auf unter 200 mg% fiel, der Blutmilchsäurewert wieder normal wurde; bei den Sorbitversuchen aber habe ich auch dann, wenn der Blutzuckerwert unter 150 mg% fiel, nicht selten eine Blutmilchsäurezunahme beobachtet. Im Vergleich zu den Hexoseversuchen ist es auffallend, dass im

Verhältnis zum Blutreduktionswert der Blutmilchsäurewert immer etwas höher ist.

3. Laktate.

Schon Cecila und Riegel (1927) haben nachgewiesen, dass die Laktate im Tierkörper als zuckerbildende Substanzen anzusehen sind.

Verf. hat Kaninchen 5–20%ige Lösungen von Natrium lacticum intraperitoneal oder intravenös injiziert und darauf die Veränderungen in dem Blutmilchsäure- und Blutzuckerwert vergleichend untersucht. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle XV zusammengestellt.

TABELLE XV.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 123 ♂ (1.980 kg)		Nr. 124 ♂ (1.830 kg)		Nr. 125 ♂ (2.250 kg)		Nr. 128 ♂ (1.820 kg)	
Injektions- methode		5 % Natrium lacticum pro kilo 10.0 ccm intravenös		10 % Natrium lacticum pro kilo 10.0 ccm intravenös		15 % Natrium lacticum pro kilo 20.0 ccm intraperitoneal		20 % Natrium lacticum pro kilo 20.0 ccm intravenös	
mg %		Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Vor der Injektion		9.38	117.6	9.47	111.6	9.89	104.0	10.11	101.0
Nach der Injektion	1/4 St.	50.73	117.6	77.09	128.9			225.00	128.0
	1/2 St.	30.38	117.6	57.23	129.6	107.14	135.6	100.00	161.0
	1 St.	19.29	117.6	19.76	114.6	112.40	151.0	77.09	130.0
	2 St.	10.00	117.6	10.11	105.4	70.00	132.0	10.34	104.7
	3 St.	9.47	118.6	9.78	110.4	41.11	122.0	10.11	108.5
	4 St.	9.38	114.6	9.38	110.4	29.62	114.1	9.78	106.6
	5 St.	9.38	114.5	9.47	110.2	19.29	108.0	9.89	105.0

Wie aus der Tabelle XV hervorgeht, ist bei einem höheren Blutmilchsäurewert als 50 mg% eine Zunahme des Blutzuckerwertes nachweisbar; wenn aber der Blutmilchsäurewert unter 50 mg% beträgt, dann ist diese Zunahme nicht nachweisbar. In Fällen mit abnorm hohen Blutmilchsäurewerten, bei z. B. über 70 mg%, ist aber die Zunahme des Blutzuckerwertes keine

bedeutende.

Nach den Ergebnissen dieser Versuche zu urteilen ist die Zuckerbildung aus Laktat nur geringfügig.

4. *Adrenalin.*

Durch Zuckergaben an Kaninchen wird die Hyperglykämie auf exogenem Wege hervorgerufen, durch Adrenalin dagegen entsteht die Hyperglykämie auf endogenem Wege; es ist daher selbsterständlich von vornherein anzunehmen, dass nach der Adrenalin-Injektion das Verhältnis zwischen Blutzucker- und Blutmilchsäurewert ein anderes sein muss, als wir es bisher bei Zucker oder zuckerbildenden Substanzen beobachtet haben. In der Tat finden wir denn auch, wie die Tabelle XVI zeigt, bei subkutaner oder intravenöser Injektion von Adrenalin deutliche Unterschiede in dem gegenseitigen Verhältnis zwischen Blutmilchsäure- und Blutzuckerwert gegenüber den bei den Versuchen mit anderen Zuckerarten bzw. zuckerbildenden Substanzen erhobenen Befunden.

Der Kurvengipfel des Blutmilchsäurespiegels fällt also nicht mit dem des Blutreduktionswerts zusammen. Der Blutmilchsäurewert erreicht den Kurvengipfel erst in 3 Stunden nach der subkutanen Adrenalininjektion, während der Blutreduktionswert ihn schon in 2 Stunden erreicht; dazu setzt noch der Blutmilchsäureanstieg etwas später ein als die Hyperglykämie. Deshalb ist die Hyperglykämie immer früher und deutlich ausgeprägt, während die Erhöhung des Blutmilchsäurespiegels meist noch unwesentlich ist.

Der Blutmilchsäureanstieg hält während 3–5 Stunden nach der subkutanen Adrenalininjektion an, während die Hyperglykämie in der Mehrzahl der Fälle 8 Stunden oder manchmal auch darüber andauert.

Ein Vergleich der Adrenalinwirkung gegenüber der der verschiedenen genannten Zuckerarten und der übrigen zuckerbildenden Substanzen zeigt, dass im Verhältnis zu dem Blutreduktionswert der Blutmilchsäurewert niedriger ist.

TABELLE XVI.

Nummer (Körper- gewicht)	Nr. 132 ♂ (2.090 kg)		Nr. 135 ♂ (2.000 kg)		Nr. 136 ♂ (2.030 kg)		Nr. 138 ♂ (1.910 kg)		Nr. 140 ♂ (1.950 kg)	
	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker	Milch- säure	Blut- zucker
Injektions- method	1 % Adrenalin pro kilo 0.3 cem sub- cutane Injektion		1 % Adrenalin pro kilo 0.4 cem sub- cutane Injektion		1 % Adrenalin pro kilo 0.4 cem intra- venöse Injektion		1 % Adrenalin pro kilo 0.5 cem intra- venöse Injektion		1 % Adrenalin pro kilo 0.6 cem sub- cutane Injektion	
mg %										
Vor der Injektion	9.18	100.9	9.78	97.8	9.47	94.8	10.00	107.6	10.34	94.0
Nach der Injektion	1/4 St.			242.5		207.4				
	1/2 St.		20.00	294.9	19.29	207.4	20.50	297.6	20.00	197.0
	1 St.	10.00	40.64	316.0	20.50	263.4	49.28	321.6	19.29	245.0
	2 St.	19.29	49.28	434.9	40.00	242.6	50.00	598.5	40.64	300.1
	3 St.	38.95	41.11	430.8	30.47	203.8	49.28	528.4	49.28	211.0
	4 St.	41.11	30.00	400.0	29.62	195.2	51.49	499.7	38.95	190.0
	5 St.	19.76	10.00	328.5	10.00	185.7	30.38	436.8	14.65	147.0
	8 St.	9.38	9.89	260.6	9.89	160.0	19.29	369.5	10.23	98.5

IV. BETRACHTUNGEN ÜBER DIE ERGEBNISSE.

Wir haben aus den Versuchen mit verschiedenen Zuckerarten und zuckerbildenden Substanzen die Beziehungen zwischen dem Milchsäurespiegel und der Blutzuckerkurve deutlich erkennen können. Unter den verschiedenen Zuckerarten wurde nach der intraperitonealen Injektion von Hexosen (Glukose, Fruktose, Mannose und Galaktose) und von Maltose eine deutliche Erhöhung der Blutmilchsäure festgestellt, wogegen diese nach der intraperitonealen Injektion von Laktose und von Pentosen (Xylose und Arabinose) nicht zu beobachten war. Nach der Verabreichung von Zuckerarten wie Hexose und Maltose sieht man eine deutliche Erhöhung des Blutmilchsäurewertes, der nach intraperitonealer Injektion dieser Zuckerarten schon innerhalb 30 Minuten zugleich mit dem Werte des Blutzuckers, den höchsten Punkt der Kurve erreicht, um dann allmählich abzuklingen.

Bezüglich der Dauer der Hyperglykämie verhielten sich die Zuckerarten etwas verschieden. Bei Glukose, Fruktose und Mannose folgte auf die 3–4 stündige hyperglykämische Phase eine hypoglykämische. Bei Galaktose und Maltose dauerte die hyperglykämische Phase über 4 Stunden an, und noch 5 Stunden nach der Zuckergabe wurde der Eintritt der hypoglykämischen Phase nicht beobachtet. Wenn nun aber auch bezüglich der Dauer der Hyperglykämie bei den verschiedenen Zuckerarten Verschiedenheiten bestanden, so war doch die Dauer der Erhöhung des Blutmilchsäurewertes bei ihnen fast bestimmt, d. h. sie dauerte bei allen Zuckerarten nicht über 1–2 Stunden p. Inj. an.

Ein Vergleich des Blutmilchsäurewertes mit dem Blutzuckerwerte ergibt, dass bei allen Zuckerarten bei einem Blutzuckerwert von über 200 mg% ein gesteigerter Blutmilchsäurespiegel zu beobachten ist, dass dagegen bei einem Blutzuckerwert von unter 200 mg% der Blutmilchsäurespiegel normal bleibt.

Bei Verabreichung von solchen zuckerbildenden Substanzen wie Sorbit und Glycerin an Kaninchen zeigte es sich, dass während in dem Falle der Verabreichung der Zuckerarten bei einem Blutzuckerwert von unter 200 mg% sich ein Blutmilchsäureanstieg

nicht nachweisen liess, nach Sorbit und Glycerin selbst bei einem relativ noch niedrigerem Reduktionswert ebenso wie bei einem Blutreduktionswert von 150 mg% ein Blutmilchsäureanstieg zu beobachten war. Weiter zeigt ein Vergleich des Höhepunktes des Blutmilchsäure- und des Blutzuckerwertes, dass der erstere im Vergleich zu letzterem bei den zuckerbildenden Substanzen (Sorbit und Glycerin) höher war als bei den verschiedenen Zuckerarten.

Bei der Adrenalininjektion handelt es sich um endogene Zuckerbildung, daher hier selbstverständlich andere Verhältnisse vorliegen als bei der exogenen Zuckerbildung nach Zuckergaben bzw. Verabfolgung von Sorbit oder Glycerin. Während bei Verabfolgung der Zuckerarten bzw. des Sorbits oder Glycerins die Kurvengipfel der Werte für die Blutmilchsäure und den Blutzucker zusammenfielen, wurde bei der Adrenalininjektion beobachtet, dass der Kurvengipfel des Blutzuckerwertes früher erreicht wurde als der des Milchsäurewertes; dazu war weiter im Verhältnis zu dem Blutreduktionswerte der Blutmilchsäurewert deutlich niedriger.

Aus dem Verhalten der Blutzuckerkurve und des Milchsäurespiegels im Blut bei der Injektion der Zuckerarten gehen die biologischen Eigenschaften derselben klar hervor. Da sich bei parenteraler Verabreichung der verschiedenen Zuckerarten nur bei der Laktose, Xylose und Arabinose eine Erhöhung des Milchsäurewertes nicht feststellen liess, so scheint es ziemlich klar, dass deren biologische Eigenschaften von denen der anderer Zuckerarten gänzlich verschieden sind.

Die Galaktose ist gegenüber den tierischen insulinhypoglykämischen Symptomen ganz wirkungslos, auch der Staubeffekt ist negativ, und es ist bei Verabfolgung derselben eine hypoglykämische Phase ebensowenig wie nach Belastung mit Laktose nachweisbar (Sawada, 1933). Die Blutmilchsäureproduktion geht bei der Galaktose wie bei anderen Hexosen vor sich, wodurch sie sich wieder von der Laktose unterscheiden lässt.

Es wird nun weiter zu entscheiden sein, ob die Zuckerbildung aus Glycerin und Sorbit im lebenden Organismus erst auf dem Wege über die Milchsäurebildung vor sich geht, sodass diese bei

der Zuckerbildung also eine grosse Rolle spielen würde, oder ob die Spaltung nicht bis zur Bildung von Milchsäure vor sich geht.

Nun haben wir aber bei den Experimenten mit Natrium lacticum gesehen, dass die daraus gebildete Zuckermenge eine nur geringe ist; auch war die nach Verabfolgung von Glycerin oder Sorbit aus Milchsäure gebildete Zuckermenge ebenfalls nur unbedeutend, wobei sich herausgestellt hat, dass die dabei entstandene Blutmilchsäure bei der Zuckerbildung im Sorbit- und Glycerintiere keine wesentliche Rolle spielt.

Borghi, Wierzechowski und Laniewski fanden, dass nach der Verabfolgung von Glukose gleichzeitig mit der Abnahme in der Alkalireserve ein Anstieg des Milchsäurewerts stattfand. R. Stöhr (1932) hat, von dem Gedanken ausgehend, dass die durch Verabfolgung von Methylglyoxal, Glycerinaldehyd und Glukose hervorgerufene starke Erhöhung des Blutzuckerwertes auf eine Glykogenmobilisierung durch Säurewirkung (intermediäre Bildung von Milchsäure) zurückzuführen sei, an Ratten Methylglyoxal, Glycerinaldehyd und Glukose verfüttert, die Alkalireserve im Blut bestimmt und dann gefunden, dass das Absinken der Alkalireserve im Blut bei Methylglyoxal und Glycerinaldehyd beträchtlich und auch bei der Glukose vorhanden ist. Er schloss daraus, dass die bei der Verabfolgung dieser Substanzen auftretende Blutzuckerwerterhöhung wahrscheinlich im wesentlichen auf eine Glykogenmobilisierung infolge von Säurewirkung zurückzuführen ist.

Verf. hat in den Fällen, in denen er an Kaninchen Glycerin, Glukose, Natrium lacticum und Salzsäure verabreichte, neben der Blutzuckeruntersuchung auch die Alkalireserve des Blutes untersucht, um einerseits festzustellen, ob durch die verabreichten Mittel in der Alkalireserve im Blut Veränderungen hervorgerufen werden, und andererseits in welchem grade durch das Absinken in der Alkalireserve des Blutes nach der Verabfolgung von Säuren oder Laktaten an die Tiere der Anstieg des Blutzuckerwerts hervorgerufen wird.

Wie die Tabelle zeigt, stellte sich bei den Glycerintieren eine beträchtliche Herabsetzung der Alkalireserve im Blut ein, und bei

der Verabfolgung von Glukose war dieser Abfall nicht gerade unbedeutend, sodass es sich hier scheinbar bei dieser Hypergly-

TABELLE XVII.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 141 ♂ (1.780 kg)				Nr. 142 ♂ (1.870 kg)			
Intraperitoneale Injektion		15 % Glyzerin pro kilo 20.0 ccm				15 % Glyzerin pro kilo 20.0 ccm			
		Alkalireserve		Blutzucker		Alkalireserve		Blutzucker	
		vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion
Vor der Injektion		60.5		98.8		58.6		100.5	
Nach der Injektion	1 St.	42.4	-18.1	192.8	94.0	41.9	-16.7	187.8	87.3
	2 St.	41.4	-17.1	202.4	103.6	45.3	-18.3	232.0	131.5
	3 St.	34.7	-25.8	274.2	175.4	29.0	-29.6	265.6	165.1
	4 St.	37.6	-22.9	239.0	140.2	33.8	-24.8	240.1	139.6
	5 St.	41.4	-19.1	205.6	106.8	33.8	-24.8	200.2	99.7
Nummer (Körpergewicht)		Nr. 143 ♂ (2.000 kg)				Nr. 146 ♂ (1.970 kg)			
Intraperitoneale Injektion		15 % Glyzerin pro kilo 20.0 ccm				15 % Glyzerin pro kilo 20.0 ccm			
		Alkalireserve		Blutzucker		Alkalireserve		Blutzucker	
		vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion
Vor der Injektion		69.1		123.0		45.7		98.2	
Nach der Injektion	1 St.	62.4	-6.7	176.2	53.2	38.1	-7.6	287.8	189.6
	2 St.	43.3	-25.8	185.9	62.6	26.4	-19.3	297.4	199.2
	3 St.	50.0	-19.1	156.2	33.2	26.4	-19.3	331.8	233.6
	4 St.	39.0	-30.1	173.4	50.4	22.1	-13.6	289.2	191.0
	5 St.	48.1	-21.0	152.4	29.4	34.3	-11.4	286.4	188.2

TABELLE XVIII.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 147 ♂ (1.860 kg)				Nr. 148 ♂ (1.970 kg)			
Intraperitoneale Injektion		15 % Glukose pro kilo 20.0 cem				15 % Glukose pro kilo 20.0 cem			
		Alkalireserve		Blutzucker		Alkalireserve		Blutzucker	
		vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion
Vor der Injektion		48.5		108.0		45.7		98.0	
Nach der Injektion	1/2 St.	35.3	-13.2	320.0	212.0	34.3	-11.4	377.4	279.4
	1 St.	35.9	-12.6	341.0	233.0	26.8	-18.9	390.2	292.2
	2 St.	37.2	-11.3	193.0	75.0	34.3	-11.4	376.5	278.5
	3 St.	41.9	-6.6	117.0	9.0	39.0	-6.7	263.3	165.3
	4 St.	57.0	8.5	100.0	-8.0	43.8	-1.9	170.8	72.8
	5 St.	64.5	16.0	96.0	-12.0	46.6	0.9	95.0	-3.0

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 149 ♂ (1.900 kg)				Nr. 150 ♂ (2.000 kg)			
Intraperitoneale Injektion		15 % Glukose pro kilo 20.0 cem				15 % Glukose pro kilo 20.0 cem			
		Alkalireserve		Blutzucker		Alkalireserve		Blutzucker	
		vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion
Vor der Injektion		43.3		96.8		48.1		106.0	
Nach der Injektion	1/2 St.	38.5	-4.8	353.9	257.1	31.9	-16.2	380.2	274.2
	1 St.	29.0	-14.3	359.6	262.8	38.5	-9.6	368.0	252.0
	2 St.	38.5	-4.8	263.6	166.8	33.8	-14.3	276.8	170.8
	3 St.	40.4	-3.1	176.9	80.1	31.9	-16.2	188.2	82.2
	4 St.	46.2	2.9	124.1	27.3	31.9	-16.2	135.8	29.8
	5 St.	51.0	7.7	94.0	-2.8	43.3	-4.8	102.0	-4.0

TABELLE XIX

Nummer (Körpergewicht)	Nr. 153 ♂ (2.340 kg)				Nr. 154 ♀ (2.000 kg)				Nr. 155 ♂ (1.780 kg)			
	20 % Natrium lacticum pro kilo 20.0 ccm intraperit				10 % Natrium lacticum pro kilo 20.0 ccm intraperit				10 % Natrium lacticum pro kilo 10.0 ccm intravenös			
Injektions- methode	Alkalireserve		Blutzucker		Alkalireserve		Blutzucker		Alkalireserve		Blutzucker	
	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion
Vor der Injektion	22.1	-25.4	172.7	76.4	33.8	-17.2	120.0	21.9	42.4	-10.4	94.2	-1.1
	24.0	-23.5	192.4	96.1	45.3	-5.7	116.0	17.9	43.3	-9.5	96.0	0.7
	19.2	-28.3	152.2	55.9	37.6	-13.4	130.4	32.3	55.7	2.9	113.0	17.7
	23.0	-24.5	147.8	51.5	43.3	-7.7	109.2	11.1	42.4	-10.4	116.4	21.1
	22.1	-25.4	161.6	65.3	51.9	0.9	98.2	0.1	57.6	4.8	91.8	-3.5
Nach der Injektion	18.3	-29.2	172.5	76.2	53.8	2.8	91.8	-6.3	47.1	-5.7	83.8	-11.5

TABELLE XX.

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 159 ♂ (1.960 kg)				Nr. 160 ♂ (2.000 kg)			
Belastungs- methode		0.25 % HCl. pro kilo 20.0 cem intraperitoneale Injektion				0.3 % HCl. pro kilo 20.0 cem intraperitoneale Injektion			
		Alkalireserve		Blutzucker		Alkalireserve		Blutzucker	
		vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion
Vor der Belastung		48.5		91.4		55.1		97.2	
Nach der Belastung	1/2 St.	24.0	-24.5	101.8	10.4	24.9	-30.2	105.8	8.6
	1 St.	23.0	-25.5	119.2	27.8	24.9	-30.2	134.6	37.4
	2 St.	21.0	-27.5	122.4	31.0	31.5	-23.6	145.8	48.6
	3 St.	24.0	-24.5	140.8	49.4	24.9	-30.2	144.2	47.0
	4 St.	24.9	-23.6	128.2	36.6	26.8	-28.3	131.7	34.5
	5 St.	25.8	-22.7	109.8	18.4	22.1	-33.0	119.1	21.9

Nummer (Körpergewicht)		Nr. 162 ♂ (2.000 kg)				Nr. 164 ♂ (2.080 kg)			
Belastungs- methode		0.5 % HCl. pro kilo 20.0 cem intraperitoneale Injektion				1.0 % HCl. pro kilo 20.0 cem per os			
		Alkalireserve		Blutzucker		Alkalireserve		Blutzucker	
		vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Injektion	vol %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Belastung	mg %	Differenz zwischen Vor u. Nach d. Belastung
Vor der Injektion		47.5		91.4		52.2		100.8	
Nach der Belastung	1/2 St.	11.7	-35.8	99.1	7.7	28.7	-23.5	109.8	9.0
	1 St.	13.6	-33.9	126.8	35.4	23.0	-29.2	116.6	15.8
	2 St.	17.4	-30.1	133.6	42.2	26.8	-25.4	92.4	-8.4
	3 St.	24.0	-23.5	122.4	31.0	17.4	-34.8	81.8	-19.0
	4 St.	19.2	-28.3	116.0	24.6	14.5	-37.7	80.9	-19.9
	5 St.	21.0	-26.5	109.5	18.1	12.6	-39.6	78.9	-21.9
	6 St.					17.4	-34.8	82.6	-18.2

kämie um die Wirkung von Säureüberschuss infolge des Absinkens der Alkalireserve handelt. Andererseits zeigt der Zusammenhang zwischen den Fällen von Salzsäure- und Laktatinjektion bezüglich des Zusammenhanges zwischen Alkalireserve und Hyperglykämie, dass bei der Salzsäureinjektion das Absinken der Alkalireserve noch stärker ist als bei der Glycerininjektion, und dass nach der Laktatinjektion eine ziemlich deutliche Abnahme der Alkalireserve im Blut nachweisbar war, während die Hyperglykämie gar nicht bedeutend war. Aus diesen Resultaten geht nun allerdings hervor, dass die durch Säurewirkung auftretende Hyperglykämie nicht bedeutend ist. Demnach ist klar, dass der beträchtliche Anstieg des Blutzuckers nach der Verabfolgung von Glycerin und Sorbit im wesentlichen nicht auf eine Glykogenmobilisierung infolge von Säurewirkung zurückgeführt werden kann. Wenn wir dagegen die Fälle betrachten, in denen durch Injektion von HCl eine leichte Erhöhung des Blutzuckers und ein starkes Absinken der Alkalireserve im Blute beobachtet wurde, so können wir schlechterdings nicht annehmen, dass bei der Glycerin-bzw. Sorbithyperglykämie diese Säurewirkung ganz ohne Einfluss sei.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche fasse ich ganz kurz wie folgt zusammen:

1. Die intraperitoneale Verabfolgung verschiedener Zuckerarten, wie Laktose, Arabinose und Xylose, an Kaninchen verursachte keinen Anstieg des Blutmilchsäurespiegels; hingegen wurde der Anstieg nach der intraperitonealen Injektion von Hexosen (Glukose, Fruktose, Mannose und Galaktose) sowie Maltose in beträchtlichem Masse erreicht.

2. Ein Vergleich zwischen dem Blutmilchsäurespiegel und der Blutzuckerkurve nach Verabfolgung der einen höheren Blutmilchsäurespiegel verursachenden Injektion von Hexosen oder Maltose ergab einen Unterschied zwischen den verschiedenen Zuckerarten bzgl. der Dauer der hervorgerufenen Hyperglykämie. Die Hyperglykämie nach der Injektion von Galaktose und Maltose dauerte im Vergleich zu der nach der Injektion anderer

Zuckerarten (Glukose, Fruktose und Mannose) länger an. Die Dauer des erhöhten Milchsäurespiegels ist aber für die einzelnen Zuckerarten fast bestimmt und beträgt ca. 1–2 Stunden, auch ist ein erhöhter Blutmilchsäurespiegel nach Einverleibung von verschiedenen Zuckerarten nur bei einem Blutzuckerwert von über 200 mg% zu konstatieren.

Bei allen Zuckerarten fallen die Kurvengipfel des Blutzucker- und des Blutmilchsäurewertes fast genau zusammen.

3. Das Verhalten zwischen Blutzuckerkurve und Blutmilchsäurekurve ist bei Verabfolgung von Sorbit oder Glyzerin anders als bei den anderen genannten Zuckerarten; d. h. nach der Erreichung des Kurvengipfels des Blutmilchsäure- und des Blutzuckerwertes ist bei den mit Sorbit bzw. Glyzerin behandelten Tieren gegenüber den Tieren, die mit anderen Zuckerarten behandelt wurden, bei einer relativ niedrigeren Blutreduktionswerterhöhung als bei der nach anderen Zuckerarten, und zwar bei einem Wert unterhalb 200 mg%, noch ein höherer Blutmilchsäurewert zu beobachten, und bei einem Vergleich der Versuche mit Sorbit und Glyzerin mit denen mit anderen Zuckerarten und Adrenalin tritt ein Blutmilchsäurewert auf, der höher ist als der Blutreduktionswert.

4. Nach der Adrenalininjektion ist das Verhalten der Blutzucker- und der Blutmilchsäurewertkurve anders als bei den Zuckerarten und dem Sorbit oder Glyzerin. Während bei diesen die Kurvengipfel auffallend zusammenfallen, geht bei den Adrenalintieren der Kurvengipfel des Blutzuckerwertes dem des Blutmilchsäurewertes voran. Es ist weiter auffallend, dass im Verhältnis zu dem Blutreduktionswert der Blutmilchsäurewert im Vergleich mit den anderen Versuchen bei der Adrenalin-Injektion deutlich niedriger ist.

5. Nach der Laktat Injektion nimmt der Blutmilchsäurewert deutlich zu, aber der Anstieg des Blutzuckerwertes ist nur unbedeutend. Auf Grund dieser Ergebnisse müssen wir annehmen, dass die durch die Sorbit- oder Glyzeringaben entstehende Milchsäure an der Zuckerbildung nur in unbedeutendem Masse beteiligt ist, und dass die dadurch entstandene Milchsäure gegen

über der Hyperglykämie bei den Versuchen mit Sorbit und Glycerin nur von untergeordneter Bedeutung ist.

6. Um zu entscheiden, ob die durch verschiedene Zuckerarten oder durch Sorbit oder Glycerin hervorgerufene Hyperglykämie nicht etwa durch die Glykogenmobilisierung durch Säurewirkung (intermediäre Bildung von Milchsäure durch Zucker, Sorbit oder Glycerin) entstanden ist, habe ich einerseits bei Tieren, denen Glukose bzw. Glycerin verabfolgt wurde, und andererseits bei Tieren, denen Salzsäure bzw. Laktat einverleibt wurde, die Alkalireserve im Blut bestimmt und dabei festgestellt, dass die Säurewirkung in keinem Falle eine wesentliche Rolle spielt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Dr. Takeda, für seine gütigste Unterstützung und Herrn Prof. Dr. Kotake (Universität zu Osaka) für freundliche Ratschläge und Durchsicht dieses Manuskriptes meinen allerherzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Araki, T. (1891, 1892, 1894): Hoppe-Seyler's Zeits., **15**, 335 u. 546; **16**, 201 u. 453; **17**, 311; **19**, 422.
 Cori, C. F. (1925): J. of biol. Chem., **63**, 253.
 Cecilia, Riegel (1927): J. of biol. Chem., **74**, 195.
 Clausen, S. W. (1922): J. of biol. Chem., **52**, 263.
 Cremer, M. (1902): Münch. med. Woch., **49**, 944.
 Collazo, J. A. u. Supuierwski, J. (1925): Bioch. Zeits., **154**, 423.
 Ders u. G. T. Cori. (1928): J. of biol. Chem., **79**, 309 u. 321.
 Elias, H. u. U. Sammartino (1921): Bioch. Zeits., **117**, 10.
 Embden, G. u. S. Isaac (1917): Hoppe-Seyler's Zeits., **99**, 297.
 Embden, G. Baldes K. u. Schmidtz, E. (1912): Bioch. Zeits., **45**, 108.
 Friedemann, T. E. and Kendall, A. I. (1929): J. of biol. Chem., **82**, 23.
 Freise, u. Walenta (1929): Med. Kli. Nr., **21**.
 Valentin, F. (1925): Münch. Med. Wochs., **72**, 86.
 Hill u. Long (1925): Ergebn. d. Physiol., **24**, 43.
 Ishii, R. (1927): Osaka Igakkai Zasshi, **26**, 1.
 Kuriyama, S. (1918): J. of biol. Chem., **34**, 269.
 Kawamura, C. (1928): Mitteil. aus d. Med. Akademie zu Kioto, Band **2**, Heft 5.

- Kinoshita, T. (1931): Mitteil. aus d. Med. Akademie zu Kioto, Band 5, Heft 6.
- Katayama, I. u. Kilian, J. A. (1926): J. of biol. Chem., 71, 707.
- Koike, T. (1933): Osaka Igakkai Zasshi, 32, 6.
- Lüthje, H. (1904): Deutsch. Arch. klin. Med., 80, 98.
- Ludwig Pincussen (1930): Mikromethodik, 5. Aufl.
- Mendel, Engel, u. Goldscheider (1925): Klin. Wochens, Nr. 6, 262.
- Morishima, K. (1900): Schmiedeberg's Arch., 43, 217.
- Mendel u. Goldscheider (1925): Bioch. Zeits., 164, 163.
- Mitani, N. u. Okazaki, T. (1930): Okayama Igakkai Zasshi, 42, 4.
- Nakatsuka, S. (1932): Mitteil. aus d. Med. Akademie zu Kioto, Band 5, Heft 3.
- Noshi, K. (1929): J. of Biochem., 11, 2.
- Noma, A. (1927): Okayama Igakkai Zasshi, 39, 7.
- Neubauer, E. (1909): Schmiedeberg's Arch., 61, 387.
- Rhu, R. (1925): Nihon Naibunpitsugakkai Zasshi, 1, 203.
- Stöhr, R. (1932): Hoppe-Seyler's Zeitsch. für Physiol. Chemie., 212, 1 u. 2.
- Schneider, E. u. Wiedmann, E. (1929): Klin. Wochens, 8, 536.
- Satta, G (1905): Beitr. Chem. Physiol. u. Path., 6, 376.
- Sawada, M. (1930): Nihon Naikagakkai Zasshi, 18, 6.
- Sawada, M. (1933): J. of Biochem., 17, No. 1.
- Stuber, B. u. Lang, K. (1926): Bioch. Zeits., 179, 70.
- Suekawa, T. (1929): Mitteil. aus d. Med. Akademie zu Kioto, Band 3, Heft 4.
- Tolstoi, E., Roebell, R. O., Levine S. Z. u. Richardson, H. B. (1924): Proc. Soc. Exp. Biol. u. Med., 21, 449.
- Thomas, P. Nash, Tr., and Stanley R. Benedict (1924): J. biol. Chem., 61, 423.
- Thompson, G. W., Voegtlin, C. and Edith R. Dunn (1925): J. biol. Chem., 64, 639.
- Thannhauser u. Meyer (1929): Münch. Med. Wochens. Nr., 9.
- Takeda, Sugawara, Tsunekawa (1930): Nihon Naikagakkai Zasshi, 17, 10.
- Takehiro, S. (1931): Mitteil. aus d. Med. Akademie zu Kioto, Band 5, Heft 3.
- Th Theodore E. Friedeman, Margherita Cotonio, and Philip A. Schaffer (1927): J. of biol. Chem., 73, 335.
- Takahata, T. (1927): Biochemische Analyse.
- Wierzechowski, M. u. Laniewski, L. (1931): Biochem. Zeits., 230, 173.
- Yamada, T. (1932): Keio Igaku, 12, 10.
- Zillessen, H. (1891): Hoppe-Seyler's Zeits., 15, 387.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ELEKTRISCHE ERSCHEINUNGEN AN DER HORNHAUT.

I. Mitteilung:

Die Potentialdifferenz der Hornhaut gegen Elektrolytlösungen.

VON

KATSUZO HAYASHI.

*(Aus dem Biochem. Laboratorium und der Augenklinik der
medizinischen Fakultät zu Nagoya, Japan.)*

(Eingegangen am 20. August 1933)

Seit Emil du Bois-Reymond, der sein Lebenswerk der Erforschung der Bioelektrizität in dem Glauben widmete, dass Elektrizität und Leben ganz eng zusammenhängen, so dass diese Forschungsrichtung wichtige Fortschritte in der Aufklärung der Konstitution des lebenden Gewebes bringen würde, wurde die Frage der tierischen Elektrizität von vielen Autoren energisch erforscht.

Was den Augapfel betrifft, so ist es auch schon seit langem bekannt, dass dieser, sei es unverletzt in situ, oder frisch isoliert, dauernd der Sitz des Bestandpotentials ist, das am Wirbeltierauge regelmässig eine solche Richtung hat, dass die Hornhaut sich positiv gegenüber dem Fundus verhält, d.h. der Strom fliesst im äusseren Schliessungskreis von der Hornhaut zum Fundus, und im Innern des Auges von dem Fundus zur Hornhaut.

Über die Entstehung des Bestandpotentials des Auges wurden bisher verschiedene Vorstellungen geäussert. Kühne und Steiner, die bei Versuchen mit isoliertem Froschbulbus und der Froschnethaut fanden, dass jeder Punkt der Nervenfaserschicht sich positiv gegen jeden Punkt der Stäbchen-Zapfenschicht verhält, nehmen an, dass die in den verschiedenen Körnerschichten gelegenen Netzhautganglienzellen nach Unterbrechung des Blutkreislaufs sehr schnell absterben, und halten es für denkbar, dass der Bestand-

strom zum Teil ein Längsquerschnittsstrom der Nervenfaserschicht sei, wobei sie die abgestorbene Ganglienzellenschicht als chemischen Querschnitt auffassen. *Waller* betrachtet den Bestandstrom des isolierten Froschbulbus als einen Alterationsstrom, hervorgerufen durch die unvermeidlichen mechanischen Insulte beim Präparieren. Dies passt jedoch nicht zu den Angaben anderer Autoren, dass auch in situ unter möglichst normalen Bedingungen untersuchte Augen eine zum Teil langdauernde Konstanz des Bestandstroms zeigen. Der Bestandstrom des Auges ist nach *Nagel* kein Demarkationsstrom. Er fasst ihn als eine Art Aktionsstrom auf. *Garten* schreibt: "Die Tatsache, dass dauernd im Auge ein nach aussen ableitbarer Strom besteht, was ja bekanntlich weder an Muskeln noch Nerven der Fall ist, führte mich zu folgendem Vergleich: wie die zahlreichen Einsenkungen der äusseren Haut, die wir als Hautdrüsen bezeichnen, stets, auch im sogenannten Ruhezustand einen einsteigenden Strom liefern, so wäre auch bei der Netzhaut das Neuroepithel im Grunde noch als ein Stück freie Oberfläche des Ectoderms anzusehen, das normalerweise ebenfalls einen einsteigenden Strom lieferte". *Beuchelt* untersuchte die Wirkung verschiedener Ionen auf das Bestandpotential der Augen von getöteten Fröschen. Er erhielt das Resultat, dass Ringerlösung, NaCl und LiCl ein mehr oder minder stark negatives Bestandpotential bewirkten, während die übrigen Lösungen von KCl, CaCl₂, BaCl₂ und Mg Cl₂ die positiven Werte des Bestandpotentials annehmen, und kommt, indem er seine eigenen Ergebnisse mit den von *Orbeli* und *Schwartz* mit den gleichen Lösungen an Froschhautströmen erhaltenen vergleicht, zu dem Schluss, dass der Augenstrom eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Hautdrüsenstrom zeigt. Diese Schlussfolgerung hat aber noch keine Zustimmung gefunden.

Nach diesen Untersuchungen sind alle Augenströme in der Netzhaut lokalisiert. Abweichend von diesem Grundsatz steht allein die Annahme, die *Lehmann* und *Meesmann* auf Grund ihrer Versuche über ein zwischen Blut und Kammerwasser bestehendes Donnanpotential angestellt haben. Diese Autoren identifizieren das von ihnen gemessene Donnanpotential mit dem Bestand-

potential des Auges, und meinen, dass das Bestandpotential mit der Netzhaut nichts zu tun hat. Das Zustandekommen des Donnanpotentials zwischen Blut und Kammerwasser wird von Dieter bestätigt, von Gaedertz und Wittgenstein aber bestritten. Immerhin ist die Beziehung des Donnanpotentials zu dem Bestandpotential des Auges noch nicht experimentell geklärt. A. Kohlrausch meint, dass das Bestandpotential des Auges nicht einheitlich zu deuten sei, und dass es sich möglicherweise aus mehreren zum Teil entgegengesetzten Einzelpotentialen zusammensetze, von denen eins das Donnanpotential zwischen Kammerwasser und Blut sein könnte.

Um das komplizierte Bestandpotential des Auges — wie Kohlrausch glaubt — zu begreifen, scheint es mir notwendig, schrittweise, vom Einfacheren zum Komplizierten übergehend, zu untersuchen. Der Zweck dieser Mitteilung ist, die elektrischen Erscheinungen und besonders das Membranpotential der Hornhaut zu erforschen, und so einen Anhaltspunkt für die Erklärung des Augenbestandstroms zu finden.

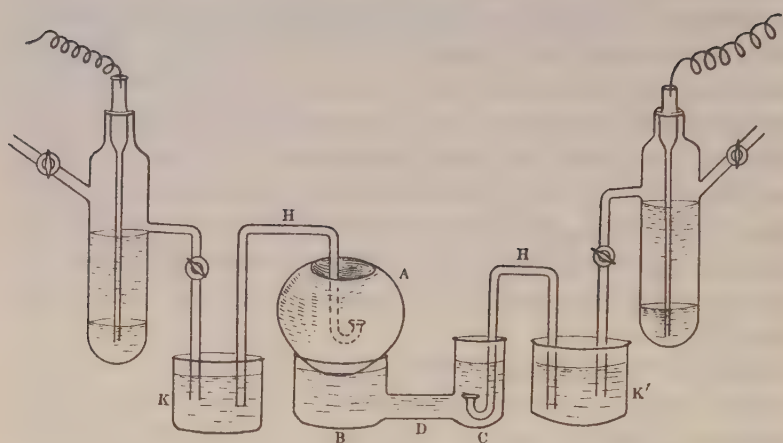
Zunächst sollen die Untersuchungen über die Potentialdifferenz der Hornhaut gegen Elektrolytlösungen besprochen werden.

VERSUCHSMATERIAL UND VERSUCHSMETHODIK.

Als Versuchsmaterial dienten Rinderaugäpfel, die sofort nach dem Schlachten enukliert und so schnell wie möglich zur Untersuchung benutzt wurden.

Die Versuchsanordnung war die folgende (Fig 1): Ein U-förmiges Glasgefäß, welches aus 2 Zylindergefäßen "B" und "C" und aus einem sie verbindenden Röhrechen "D" besteht, wird mit einer Elektrolytlösung gefüllt. Ein Augapfel "A" wird, mit nach unten gerichteter Hornhaut, auf das Zylindergefäß "B" aufgesetzt, und ein kleiner Bezirk der Hornhaut von etwa 1 cm Durchmesser wird mit der Elektrolytlösung in Berührung gebracht. Oben an dem hinteren Pol des Augapfels wird ein kreisförmiges Stück der Bulbuswand entfernt. In den Glaskörper wird ein Glasheber "H" getaucht, welcher mit KCl gesättigter 3%iger Agargallert gefüllt ist. Ein anderer mit KCl gesättigter Agar-

Fig. 1.



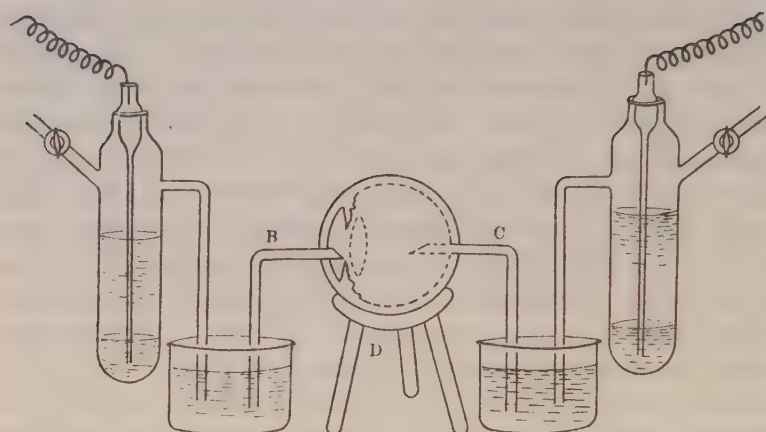
heber "H" befindet sich in der Elektrolytlösung, und zwar in dem Zylindergefäß "C". Diese Ableitung hat den Zweck alle Diffusionspotentiale zu vernichten, mit Ausnahme des Potentialunterschiedes der Hornhaut gegen die Elektrolytlösung. Das eine Ende der Glasheber ist nach oben gebogen und etwas trichterförmig erweitert. Diese Erweiterung ist frei von Agar, und in die Spitze des Trichterchens werden vor der Benutzung einige Kristalle KCl eingefüllt; dann wird vorsichtig der eine Glasheber in die Lösung und der andere in den Glaskörper eingetaucht. In den Trichtern entsteht alsbald eine mit KCl gesättigte Lösung der Elektrolytlösung bzw. des Glaskörpers. Dies dank dem von Michaelis und Fujita beschriebenen Verfahren, das den Zweck hat, noch vorhandene Diffusionspotentiale zwischen der gesättigten KCl-Lösung in Agar und den angrenzenden wässrigen Lösungen möglichst vollständig zu vernichten. Durch die Aufbiegung des trichterförmigen Endes wird verhindert, dass die schwere KCl-Lösung in die Lösung bzw. intraokulare Flüssigkeit heruntersinkt und die Grenzfläche gegen die Hornhaut verunreinigt. Die Agarheber "H", "H'" tauchen andererseits in die Gefäße "K", "K'", welche gesättigte wässrige KCl-Lösungen enthalten, und von hier wird das Potential beiderseits durch mit KCl gesättigte Kalomelektroden

abgeleitet. Das Potential wird mittels des Kompensationsverfahrens nach Du Bois-Reymond und Poggendorff gemessen. Als Nullinstrument diente ein Kapillarelektrometer. Wir messen somit den Potentialunterschied des Glaskörpers gegen die äussere Elektrolytlösung in dem Glassgefässe. Die Elektrolytlösungen werden einerseits in Form von Chloriden variierter Kationen und andererseits in Form von Kaliumsalz variierter Anionen angewendet. Der Konzentrationsbereich erstreckt sich in der Regel von 1,0 n bis 0,001 n; in vereinzelten Fällen wurde diese Grenze überschritten. In Anbetracht der Autolyse habe ich die einzelnen Versuche nicht zu lange ausgedehnt, längstens 2 Stunden lang. Ferner benutzte ich, da das Hornhautgewebe leicht durch Salzlösungen verunreinigt wird oder Läsionen bekommen kann, eine Hornhaut meistens nur zu einer Messung. Deshalb war es nötig, aus Messungen mehrerer Hornhäute den Mittelwert zu ziehen und von ihm aus die Wirkungen einer ganzen Reihe von Salzen zu vergleichen.

DIE POTENTIALDIFFERENZ DER HORNHAUT GEGEN DIE AUGENINNENFLÜSSIGKEIT.

Bevor wir die elektromotorische Kraft der Hornhaut gegen Elektrolytlösungen durch die angegebene Methode messen, müssen wir erforschen, ob es überhaupt Potentialdifferenzen zwischen Hornhaut, Kammerwasser und Glaskörper gibt. Mit den folgenden Versuchsmethoden wurden deshalb die Potentialdifferenzen des Glaskörpers gegen die Hornhaut und gegen die Vorderkammer gemessen. Die Ableitung erfolgte bei der Hornhaut durch ein mit gesättigter KCl-Lösung gefülltes Zylindergefäss und beim Glaskörper mittels eines KCl-Agarhebers. Zur Messung der elektromotorischen Kraft der Vorderkammer gegen den Glaskörper wurde eine besondere Apparatur wie in der beistehenden Skizze (Fig. 2) verwendet. "B" und "C" sind KCl-Agarheber, die ein spitzes Ende haben, und von denen der eine in die Vorderkammer und der andere in den Glaskörper gesteckt wird. "D" ist die Unterlage des Augapfels, die aus einem Glasring mit drei Beinen besteht. Die Einstellung der Potentiale war ziemlich schnell und

Fig. 2.



beständig. Die gefundenen Werte sind in den Tabellen I und II zusammengestellt; die Werte bedeuten Millivolt und beziehen sich auf Glaskörper bzw. Vorderkammer.

TABELLE I.

Potentialdifferenz zwischen Glaskörper und Kammerwasser.

Das Vorzeichen bezieht sich auf den Glaskörper.

Zeit der Messung nach der Ansetzung.	Augapfel				
	1	2	3	4	5
Sofort	0.2	0.5	0	1.5	-0.2
1'				1.3	
2'	0.5		0		0
3'				1.0	
4'					0
5'	0.3	0.2	0	0.8	
10'	0.3	0.2	0	0.7	0
15'	0.2	0.2			
20'	0.2				
25'					
30'					

TABELLE II.
Potentialdifferenz zwischen Glaskörper und Hornhaut.
Das Vorzeichen bezieht sich auf den Glaskörper.

Zeit der Messung nach Ansetzung	Augapfel			
	1	2	3	4
Sofort	-2.5	-2.5	-1.0	
1'				0.8
2'			-0.7	
3'				0.7
4'		-1.5		
5'	-0.5		-0.5	
10'	-0.0	-1.0	-9.5	0.7
15'	-0.2	0.5	-0.5	
20'		0.6		
25'				

Aus den Tabellen geht deutlich hervor, dass diese Werte innerhalb der Fehlergrenze Null sind, und hieraus kann man schliessen, dass keine entschiedene Potentialdifferenz zwischen den oben genannten Teilen des Auges vorhanden ist.

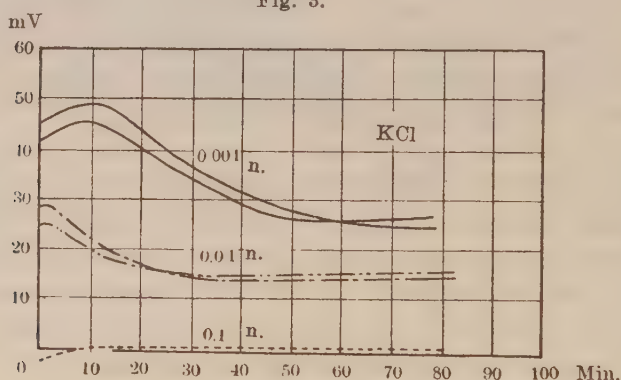
DER ZEITLICHE VERLAUF DER ELEKTROMOTORISCHEN KRAFT.

Negel hat bemerkt, dass die EMK bei isolierten Netzhäuten von Warmblütern sehr schnell sinkt, langsamer bei den Froschnetzhäuten und viel langsamer an isolierten ganzen Froschaugen, die nach seinen Angaben noch nach vielen Stunden nicht stromlos sind. Waller und Westerlund stimmen nach ihren Versuchen am isolierten Froschauge darin überein, dass das Bestandpotential sehr schnell sinkt. Nach Kühne und Steiner ist aber das Bestandpotential des isolierten Froschauges so beständig, dass eine Umkehr nur ausnahmsweise vorkommt. Völlig intakte Augen in situ zeichnen sich durch grössere Konstanz des Bestandpotentials aus; doch kommt auch hier langsames Absinken und Ansteigen vor (Broscia und Kohlrausch). Die Verschiedenheit der Resultate bei isolierten Augen ist wohl auf Unterschiede der Versuchsbedin-

gungen und Präparate zurückzuführen. Hashida hat durch Versuche mit Froschhaut, die im Bau eine gewisse Ähnlichkeit mit Hornhaut hat, die zeitliche Veränderlichkeit ausführlich erforscht und dabei 2 Typen unterschieden: Der erste Typus, den man bei kleineren Konzentrationen der Ableitungsflüssigkeit findet, ist dadurch charakterisiert, dass die EMK anfangs mit grösserer, und dann mit immer geringer werdender Geschwindigkeit allmählich zunimmt, und nachdem sie ihren Maximalwert erreicht hat, wieder anfangs mit grösserer, später mit kleinerer Geschwindigkeit abnimmt, um endlich ihren endgültigen Wert zu erreichen. Den Verlauf vom zweiten Typus nennt er Fälle, in denen die EMK anfangs mit sehr grosser Geschwindigkeit schnell den Maximalwert erreicht, und dann im umgekehrten Sinn wie beim ersten Typus verläuft. Der II. Typus tritt erst bei grösseren Konzentrationen zutage.

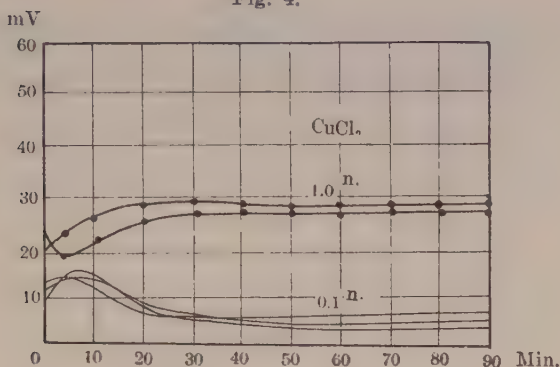
Meine Ergebnisse sind folgende:

Fig. 3.



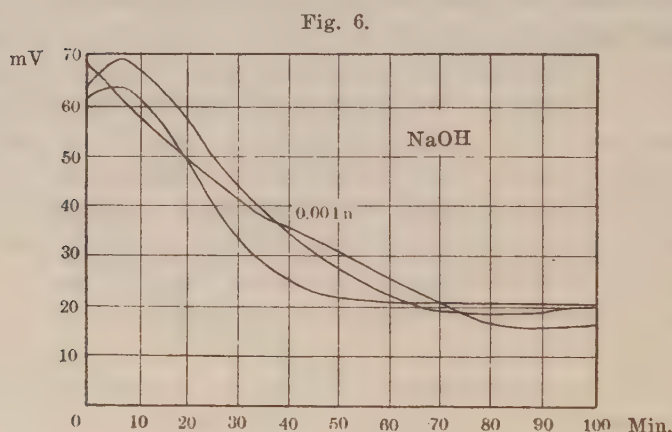
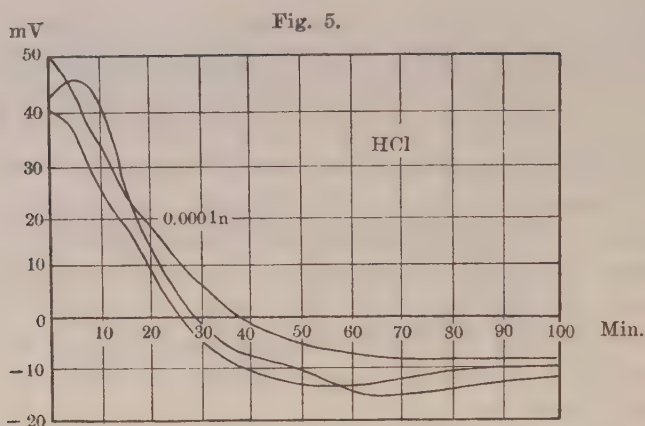
Bei 0.001 n KCl-Lösung sieht man, wie Fig. 3 zeigt, häufig im Beginn des Versuches einen Aufstieg der Potentiale, der nach der Maximumbildung allmählich absinkt, um endlich einen quasistationären Zustand zu erreichen. Dieser wird meistens erst 50 bis 60 Minuten nach dem Beginn erreicht, zuweilen aber sogar nach 100 Minuten noch nicht. Die Kurven von 0.01 n KCl-Lösung zeigen anfangs etwas steile, dann langsame Verminderung der

Fig. 4.



EMK bis zum Gleichgewicht, welches sich nach etwa 40 Minuten einstellt und bis zu 100 Minuten, wo die Messung abgebrochen wurde, keine merkliche Schwankung aufweist. Die EMK gelangt bei 0.1 n KCl-Lösung ziemlich schnell bis zum Gleichgewichtszustand und zeigt bei 1.0 n Lösung fast keine zeitliche Veränderung. NaCl, LiCl, NH_4Cl , RbCl, BaCl_2 , AlCl_3 , KNO_3 , KBr, $\text{K}_3\text{Fe CN}_6$ und $\text{K}_4\text{Fe CN}_6$ verhalten sich im grossen und ganzen ähnlich wie KCl, abgesehen von den einzelnen absoluten Werten der EMK. Bei 0.1 n CuCl_2 -Lösung zeigt die Potentialkurve Schwankungen im Sinne des ersten Typus nach Hashida und bei 1.0 n CuCl_2 -Lösung bemerkt man entweder den zweiten Typus nach Hashida oder eine zuerst schnelle und dann langsame Steigerung des Potentials bis zum quasistationären Zustande. Am auffallendsten sind die zeitlichen Veränderungen bei 0.0001 n Lösung von HCl und 0.001 n Lösung von NaOH. Die Differenz zwischen dem Anfangs- und dem endgültigen Wert der Potentiale beträgt hier um je circa 40 MV und 60 MV.

Soweit meine Versuche zeigen, kann man im allgemeinen sagen, dass die zeitlichen Veränderungen der EMK sowie individuelle Verschiedenheiten je nach der Konzentration der Elektrolytlösung verschieden sind. Sie sind im allgemeinen in verdünnten Lösungen bedeutend, dagegen in konzentrierten gering. Die zwei Typen von EMK-Kurven nach Hashida sind wirklich beobachtet worden, doch nicht gesetzmässig, und es gibt auch Fälle,



in denen dauerndes Absteigen oder keine Veränderung des Potentials stattfindet.

IONENWIRKUNGEN AUF DIE EMK DER HORNHAUT.

(Hierzu Tabelle III).

a). Bei 0,001 n Lösungen von Alkalichloriden und Kaliumsalzen von einwertigen Anionen sind die positiven Werte der EMK in bezug auf die Lösungen, wenn diese sofort nach dem Ansetzen gemessen werden, ziemlich gross (40–45 Millivolt), nehmen mit der Zeit ab und stellen sich im quasistationären Zustande auf das

TABELLE III.

Potentialunterschied der Hornhaut gegen Elektrolytlösungen im quasistationären Zustande, Mittelwert aus mehreren

Messungen. Eingeklammerte Zahlen zeigen die Anfangswerte der Potentiale.

Art der Elektrolyte	Konzentration in Aequivalentnormal			
	1.0	0.1	0.01	0 001
LiCl	10.0	4.0	(25.0) 14.0	(42.0) 17.5
NaCl	4.0	2.0	(25.0) 12.0	(45.0) 17.5
KCl	-1.0	0.0	(25.0) 15.0	(43.0) 24.0
RbCl		4.5	(22.0) 10.0	
NH ₄ Cl	-4.0	-5.0	(20.0) 12.0	(40.0) 27.5
BaCl ₂	15.0	3.5	4.5	(23.0) 15.0
CaCl ₂	19.0	5.0	6.5	(28.0) 25.0
CuCl ₂	26.0	6.0	(18.0) 0.	(40.0) 26.0
AlCl ₃	28.0	12.0	(26.0)-12.0	(40.0) -5.0
HCl		(-26)-18.0	(-22)-28.0	(-13.0)-25.0
			((0.0001 (38.0)-5.0))	
KBr	-3.0	-5.5	13.0	(44.0) 26.0
KNO ₃	-8.0	-4.0	(22.0) 10.0	
KSCN	-7.0	-2.0	(20.0) 10.0	(44.0) 34.0
K ₂ SO ₄	-14.0	-8.0	(16.0) 0.0	(40.0) 15.0
K ₃ FeCy ₆	-26.0	-10.0	(20.0) 14.0	(15.0) 24.0
K ₄ FeCy	-30.0	-12.0	(20.0) 12.0	(40.0) 20.0
NaOH		14.0	(38.0) 16.0	(65.0) 18.0

Potential von 30–20 Millivolt ein. Das Verhalten bei Chloriden zweiwertiger Kationen ist aber etwas anders. Bei Chloriden vom zweiwertigen Ba und Ca sind die erst gemessenen Werte etwas kleiner als bei sonstigen, doch mag das zufällig sein. Das Chlorid vom dreiwertigen Al zeigt anfangs auch ein positives Potential von 40–30 Millivolt, dann schnelles Absteigen und zuletzt die Umkehrung des Vorzeichens. Auffallend ist es, dass HCl von Anfang an ein negatives Potential zeigt. Erst in der Konzentration von 0,0001 n hat HCl das positive Potential von 40–30 Milli-

volt, welches aber auch endlich ins Negativ umschlägt. (Siehe Fig. 5).

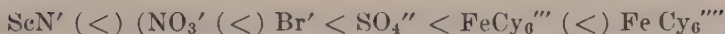
b). Bei 0,01 n Lösungen von Alkalichloriden und Kaliumsalzen einwertiger Anionen betragen die EMKK meist im Beginn der Messung ca. 20 und im quasistationären Zustande 15–12 Millivolt. Bei CuCl_2 und K_2SO_4 sind die EMKK im Gleichgewicht = 0, während sie bei BaCl_2 und CaCl_2 von Anfang bis zum Ende einen ziemlich konstanten Wert, von ca. 5 Millivolt, behalten. AlCl_3 ist hier auch negativierend, und die EMK beträgt –12 Millivolt im quasistationären Zustande. Noch stärker negativierend ist HCl . Der Anfangswert beträgt –22 und der Gleichgewichtswert –28 Millivolt. Die Kaliumsalze von FeCy_6'' und FeCy_6''' verhalten sich ganz in demselben Sinne wie binäre einwertige Neutralsalze. Auffällig sind dagegen bei 0,01 n NaOH das ungewöhnlich schnelle Absteigen und die darauf folgende Beständigkeit der Potentiale im Betrag von ca. 15 Millivolt. (Siehe Fig. 6).

Mit Versuchen an den Potentialen der Hornhäute mit verdünnten Elektrolytlösungen kann man also den speziellen Einfluss aller Ionen nicht feststellen, mit Ausnahme der H- und Al-Ionen.

c). Bei der Konzentration von 0,1 n zeigen NH_4 und Rb negative Potentiale, während K Null und Na und Li positive Potentiale zeigen. Auf Grund dieses Versuches (s. Tabelle III) lassen sich die einwertigen Alkalikationen nach abnehmendem Potentiale in folgender Reihe ordnen:



Dabei bedeutet das Zeichen "(>)" einen kleinen, eventuell nur durch Zufälligkeiten bedingten Unterschied der Potentiale und ">" einen deutlichen Unterschied. Dieses Resultat zeigt eine vollkommene Ubereinstimmung mit der Hofmeisterschen Ionenreihe. Die Chloride der zweiwertigen Kationen Ba, Ca und Cu produzieren höhere positive Potentiale, und am höchsten AlCl_3 . Wenn man Anionen mit dem gemeinsamen Kation K variiert, so ist das Potential bei der Konzentration von 0,1 n überall negativ, ausschliesslich der OH-Ionen. Die Reihenfolge nach steigender Negativierung ist folgende:



Hieraus sieht man also, dass das negative Potential mit steigender Wertigkeit zunimmt. Ganz anders verhalten sich die OH-Ionen, welche ein entschieden positives Potential zeigen. Für meine Versuche wurden OH-Ionen immer in der Form von NaOH benutzt. Die Differenz zwischen K und Na ist jedoch immer gering.

d). Bei 1,0 n Elektrolytlösungen sind die EMKK im wesentlichen gleichsinnig mit den bei 0,1 n beobachteten, und die Grössendifferenz der EMKK bei beiden Konzentrationen ist meistens nicht bedeutend. Bemerkenswert ist, dass die Potentiale bei KCl und NH_4Cl negativ und die bei Li und Na positiv sind. Bei Ca, Ba und Cu sind die Potentiale viel positiver als bei 0,1 n, am auffallendsten bei Al. Beim letzteren beträgt der Wert ungefähr 30 Millivolt. Bei den einwertigen Anionen Br, NO_3 und SCN sind auch, wie bei 0,1 n Lösungen, keine merklichen Unterschiede zu konstatieren. Bei SO_4'' , $\text{Fe Cy}_6'''$ und FeCy_6'''' nehmen die negativen Potentiale mit steigender Wertigkeit bedeutend zu. K_2SO_4 —15 Millivolt, $\text{F}_3\text{Fe Cy}_6$ —26 Millivolt und $\text{K}_4\text{Fe Cy}_6$ —30 Millivolt. Wegen zu starker Aetzung wurden bei HCl und NaOH die 1,0 n Lösungen nicht angewendet.

Diese Beobachtungen können folgendermassen zusammengefasst werden: Bei geringeren Konzentrationen (0,001 n, 0,01 n) sieht man keine sichere Reihe der Ionenwirkungen und nur bei stärkeren Konzentrationen (0,1 n, 1,0 n) die spezielle Wirkung aller Ionen auf die Potentiale. Die Ionenwirkung, wenn sie sich überhaupt bemerkbar macht, ist derart, dass die positivierende der Kationen im allgemeinen mit steigender Wertigkeit auch zunimmt, und überdies eine Übereinstimmung mit der Hofmeister-Spiro'schen Ionenreihe erkennbar ist. Als Ausnahmen verhalten sich H- und OH-Ionen.

KONZENTRATIONSEFFEKT.

Die Potentialdifferenzen der Hornhaut gegen Elektrolytlösungen wurden bisher nur in folgender Kette gemessen:

Elektrode |₁ Elektrolytlösung |₂ Hornhaut |₃ Augeninnenflüssigkeit |₄ Elektrode. In dieser Kette kann bei der Identität

der Elektroden durch diese keine Potentialdifferenz entstehen, ebensowenig zwischen Elektrode und Elektrolytlösungen (1) bzw. Augeninnenflüssigkeit (4).: Die Benutzung von KCl-Agarheber und das Einschalten von KCl-Kristallen vernichten die etwa vorhandenen Diffusionspotentiale. Ferner ist es schon erwiesen, dass die Potentialdifferenz zwischen der Hornhaut und der Augeninnenflüssigkeit (3) praktisch vernachlässigt werden kann. Allein die Berührung der Hornhaut mit der Elektrolytlösung (2) ist für die Entstehung des Stromes verantwortlich.

Die Differenz zweier solcher Messungen ergibt eine elektromotorische Kraft folgender Anordnung:

Elektrode | Lösung I |₂ Hornhaut-Augeninnenflüssigkeit-Hornhaut |₃ Lösung II |₄ Elektrode.

Die dritte Spalte kann einfach als Hornhaut beschrieben werden, wenn man annimmt, dass die Hornhaut beiderseits symmetrisch mit Epithelien bekleidet sei.

Hierbei sind alle Fehler ausgeschaltet, die durch die Ungleichmässigkeit der Elektroden oder des Gewebes entstehen können. Die elektromotorische Kraft ist ausschliesslich an den Berührungstellen der Hornhaut mit den Lösungen I und II, also bei 2 und 3 lokalisiert.

Wenn man als beiderseitige Berührungsflüssigkeiten eine Elektrolytlösung von verschiedenen Konzentrationen wählt, also konzentrierte Elektrolytlösung | Gewebe | verdünnte Lösung desselben Elektrolytes, so gelangt man zu interessanten Resultaten, die die Ursachen der elektromotorischen Kraft der Gewebsketten weiter aufklären könnten. Diesen Effekt verschieden konzentrierter Lösungen desselben Salzes nennt Beutner den "elektromotorischen Konzentrationseffekt" an Geweben.

Wenn die Nernstsche Silbersalzkonzentrationsskette

Ag | Konzent. AgNO₃-Lösung—Verdünnte AgNO₃-Lösung | Ag in veränderter Reihenfolge angeordnet wird, nämlich mit einem Stück Silber zwischen zwei verschieden konzentrierten AgNO₃-Lösungen:

Verdünnte AgNO₃-Lösung | Ag | Konzent. AgNO₃-Lösung
so ist diese vergleichbar mit der Kette

Verd. Salzlösung | Gewebe | Konzent. Lösung desselben Salzes.

Angenommen, dass das Kation allen drei Phasen gemeinsam ist, und die Konzentrationen der beiden Salzlösungen C_1 und C_2 sind, so wird die elektromotorische Kraft E nach Nernstscher Formel gezeigt:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_1}{c_2}$$

wo R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, n = Valenz der Ionen, F = das Faradaysche Äquivalent, d.h. die Strommenge, die ein Grammäquivalent elektrolytisch zersetzen kann.

Falls das Anion dem Gewebe und den Lösungsphasen gemeinsam ist, wird diese Kette in bezug auf Anionen umkehrbar, und auch das Vorzeichen der elektromotorischen Kraft wird umgekehrt.

Wenn das Verhältnis der Konzentrationen beider Lösungen 10:1 ist, sollte sich nach der Nernstschen Formel bei der Silbersalzketten ein Konzentrationseffekt von 0,058 Volt — oder besser, mit Berücksichtigung der Aktivitäten, noch etwas kleiner — erwarten lassen.

Aus solchen Gedankenfolgen wurden aus der Tabelle III die Konzentrationseffekte an der Hornhaut, d.h. die Differenzen der Potentialen von zwei Lösungen eines Salzes, deren Konzentrationen sich wie 10:1 verhalten, berechnet. Tabelle IV stellt diese Ergebnisse dar. Die zweite Kolumne enthält die Konzentrations-effekte der beiden Lösungen 0,01 n:0,001 n, wo man bemerkt, dass alle angegebenen Werte gleiche Richtung haben, d.h. dass die verdünnten Lösungen überall positiver als die konzentrierten sind. Dies stimmt mit dem von MacDonald an Kaltblüternerven konstatierten und ebenso mit dem von Beutner an Pflanzengewebe erhaltenen Resultat überein. Bei der Konzentrationskette 0,01 n:0,1 n bemerkt man dagegen, dass die Richtung der Konzentrationswirkung im quasistationären Zustande umgekehrt ist bei CuCl_2 , AlCl_3 und HCl . Der Konzentrationseffekt von 1,0 n:0,1 n, der in der vierten Kolumne angegeben ist, zeigt diese Umkehrung noch auffallender und umfangreicher.

TABELLE IV.
Konzentrationseffekte, die aus der Tabelle III berechnet wurden, und Membraneffekte.

Elektrolyte.	Konzentrationseffekt.			Diffusions- potential. (0.1 : 0.01)	Membran- effekt. (0.1 : 0.01)
	0.01 : 0.001	0.1 : 0.01	1.0 : 0.1		
LiCl	3.5	10.0	-6.0	-18.8	28.8
NaCl	5.0	10.0	-2.0	-11.6	21.6
KCl	9.0	15.0	1.0	-0.4	15.4
RbCl		14.5		-0.67	15.2
NH ₄ Cl	15.5	17.0	-1.0		
BaCl ₂	10.5	1.0	-11.5	-18.3	19.3
CaCl ₂	18.5	1.5	-14.0	-19.9	21.4
CuCl ₂	26.0	-6.0	-20.0	-11.0	5.0
AlCl	7.0	-24.0	-16.0	-28.7	4.7
HCl	3.0	-10.0		38.0	-48.0
KBr	10.0	-21.5	-2.5	-1.06	22.6
KNO		14.0	4.0	1.4	12.6
KSCN	24.0	12.0	5.0	0.7	11.3
K ₂ SO ₄	15.0	14.0	6.0	13.4	0.6
K ₃ FeCy ₆	10.0	24.0	16.0	22.0	2.0
K ₄ FeCy ₆	8.0	24.0	18.0		
NaOH	2.0	2.0		-34.6	36.6

Alle Chloride von variierten Kationen zeigen die Negativierung der verdünnteren Lösung, abgesehen von KCl. Bei Kaliumsalzen von variierten Anionen sieht man meistens einen positiven Konzentrationseffekt, welcher bei einwertigen Anionen klein und bei mehrwertigen Anionen grösser ist. Eine Ausnahme ist KBr, bei dem eine Negativierung der verdünnteren Lösung eintritt, doch innerhalb der Fehlergrenze.

MEMBRANEFFEKT.

Wenn zwei wässrige Lösungen verschiedener Konzentration ein und desselben Elektrolytes sich direkt berühren, so entstehen

an dieser Kontaktstelle sogenannte Diffusionspotentiale, die auf Grund der Iontentheorie von NERNST erklärt und folgendermassen berechnet werden können:

$$E = 0,058 \frac{\alpha}{u} - \frac{\beta}{v} \log \frac{c_1}{c_2}$$

wo u und v die Wanderungsgeschwindigkeiten des Kations und Anions, α und β die Wertigkeiten des Kations und Anions, C_1 und C_2 die Konzentrationen der beiden Lösung bedeuten.

Da K und Cl fast gleiche Wanderungsgeschwindigkeit haben, ergibt sich aus der obigen Formel, dass verschieden konzentrierte KCl -Lösungen bei freier Diffusion kein messbares Diffusionspotential ergeben. Wenn sich aber zwischen zwei KCl -Lösungen verschiedener Konzentration eine Membran, z. B. in unserem Falle Hornhaut, befindet, so erhält man eine Potentialdifferenz, die bei KCl 0,1 n : 0,01 n ungefähr 15 Millivolt beträgt (Tabelle IV). Dies ist ein Beweis dafür, dass die Wirkung der Membran für die Entstehung der Potentiale verantwortlich ist.

Wenn wir nun die Konzentrationseffekte mit den freien Diffusionspotentialen vergleichen, so bemerken wir, dass die ersteren im Vergleich zu den letzteren in manchen Fällen positiver sind.

Die Differenz zwischen den beiden ist aber bei den verschiedenen Elektrolyten nicht gleich. Diesen Unterschied wollen wir den Membraneffekt nennen. Tabelle IV enthält diese Resultate. (Die hier gegebenen Diffusionspotentiale wurden nach der oben angegebenen Formel berechnet. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der Ionen stammen aus den Werten nach KOHLRAUSCH für 18°C.).

Die Variation der Kationen bei gleichem Anion zeigt folgendes: Die Chloride der Alkalimetalle und der Erdalkalimetalle geben sämtlich ziemlich deutlichen positiven Membraneffekt von fast gleicher Grössenordnung (15–25 Millivolt). Bei den Chloriden der Schwermetalle Cu und Al , bei denen die Konzentrationseffekte

schon ins Negativ umschlagen, sind die Membraneffekte auch auffallend klein, praktisch fast null. Das H-Ion in Form von HCl verhält sich aber ganz anders. Bei ihm kehrt sich der Membraneffekt entschieden ins Negativ um. Wenn wir die Kaliumsalze der verschiedenen Anionen miteinander vergleichen, so ist der Membraneffekt bei einwertigen grösser als bei mehrwertigen. Bei SO_4'' und $\text{Fe Cy}_6'''$ ist der Effekt praktisch null. Besonders hervorzuheben ist zuletzt das OH-Ion in Form von NaOH, welches stark positivierenden Membraneffekt zeigt.

Die Deutung dieser Membraneffekte ist die folgende: Wenn der Konzentrationseffekt positiver als das Diffusionspotential steht, also wenn sich ein positiver Membraneffekt zeigt wie bei den Neutralsalzen, so kann die Deutung nur sein, dass die Beweglichkeit der Anionen innerhalb der Membran sich im Vergleich zu der der Kationen und im Vergleich zur freien Diffusion relativ verkleinert. Dagegen ist die Umkehrung der Membraneffekte, d. h. eine Negativierung der verdünnteren Lösung im Vergleich zur freien Diffusion darauf zurückzuführen, dass die Kationen hier umgekehrt relativ langsamer in die Membran wandern als bei der freien Diffusion. Das, worauf diese Umkehrung beruht, hängt wahrscheinlich von der elektrischen Ladung der Membran ab. Ich werde diese Frage ausführlicher in einer der folgenden Mitteilungen behandeln.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Rinderhornhaut übt bei den Alkalichloriden und Erdalkalichloriden einen positivierenden Einfluss auf das Potential der verdünnteren Lösung einer Diffusionskette aus.

2. Bei Chloriden vom zweiwertigen Cu und dreiwertigen Al wird der Effekt der Membran fast bis auf Null herabgedrückt.

3. Ist das Kation das H-Ion, so wird der Membraneffekt stark negativiert.

4. Kaliumsalze von SCN, NO_3 und Br erhalten durch die Hornhaut positivierenden Effekt, und NaOH einen noch viel stärkeren.

5. Handelt es sich um das zweiwertige Anion SO_4'' und das

dreiwertige Anion FeCy_6''' , so ist der Membraneffekt meist gleich Null.

LITERATUR.

- Beuchelt, H. (1921): Z. Biol., **73**, 205.
 Beutner, R. (1920): Die Entstehung elektrischer Ströme in lebenden Geweben.
 Brosea, A. und Kohlrausch, A. (1913): Arch. Physiol., 460–462.
 Dieter, W. (1925): Arch. Augenheilk., **96**, 179.
 Garten, S. (1907): v. Graefe-Saemischs Handbuch d. ges. Augenheilk., I. Teil, Kap XII, **3**, 233 ff.
 Gaedertz, A. Wittgenstein, A. (1927): v. Graefes Arch., **118**, 738; **119**, 395; **119**, 403.
 Hashida, K. (1922): Journal of Biochemistry, **1**.
 Kohlrausch, A. (1931): Handb. d. norm. u. pathol. Physiol., **7**, 1393.
 Kühne, W. und Steiner, A.: Zitiert nach Kohlrausch.
 Lehman, G. und Meesman, A. (1924): Pflügers Arch., **205**, 210.
 MacDonald: Zit. nach Beutner.
 Nagel, W. (1904): Nagels Handb. d. Physiol., **3**, 102.
 Michaelis, L. und Fujita, A. (1924): Zeitschr. f. physik. Chem., **110**, 266.
 Orbeli (1910): Z. Biol., **54**, 329.
 Schwartz, A. (1915): Pflügers Arch., **162**, 547.
 Waller, A. D. (1905): Kennzeichen des Lebens, 33–34, Berlin.
 Westerlund, A. (1907): Skand. Arch. Physiol., **19**, 346, zit. nach Kohlrausch.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ELEKTRISCHE ERSCHEINUNGEN AN DER HORNHAUT.

II. Mitteilung:

Fortgesetzte Untersuchungen über Potentiale an der Hornhaut.

VON

KATSUZO HAYASHI.

(Aus dem biochemischen Laboratorium und der Augenklinik
der medizinischen Fakultät zu Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 20. August 1933)

I. Versuche mit isolierten, frischen Hornhäuten.

In der vorigen Mitteilung wurde die elektromotorische Kraft der Rinderhornhaut nur in der Kette von

Elektrode mit gesätt. KCl	Elektrolyt- lösung	Hornhaut mit Augeninnen- flüssigkeit	Elektrode mit gesätt. KCl
------------------------------	-----------------------	--	------------------------------

untersucht, und die Membraneffekte daraus berechnet. Welches wäre nun das Ergebnis, wenn wir die Anordnung der Kette in der Weise modifizierten, dass die isolierte frische Membran beiderseits mit verschiedenen konzentrierten Lösungen eines und desselben Elektrolyten sich berührt? Nämlich:

Elektrode mit gesätt. KCl	Elektrolyt- lösung I	Hornhaut	Elektrolyt- lösung II	Elektrode mit gesätt. KCl,
------------------------------	-------------------------	----------	--------------------------	----------------------------------

Diese Art von Untersuchungen der Membranpotentiale haben wir früher in den Modellversuchen mit Kollodiummembran u.s.w. benutzt.

Die Versuchsmethodik ist folgende: Eine sorgfältig herausgeschnittene Rinderhornhaut wird über die untere Öffnung eines zylindrischen Glasgefäßes, die Epithelseite nach aussen gerichtet, gespannt; der überstehende Teil der Hornhaut wird nach oben umgeschlagen und mit Baumwollzwirn fest angeschnürt, und dabei

noch existierende Lückchen zwischen Membran und Gefässende mit Paraffin fest verschlossen. Um eine Beschädigung der Hornhaut möglichst zu vermeiden, ist es ratsam, diese beim Festbinden nicht zu straff zu spannen. Die Membran schliesst das Gefäss so wasserdicht ab, dass in beliebig langer Zeit daraus kein einziger Tropfen quillt, wenn es innen mit Flüssigkeit gefüllt und aussen Luft ist. Man muss sich vorstellen, dass es infolge der Kapillarität wasserdicht schliesst, da eine ziemlich schnelle Diffusion gelöster Substanzen eintritt, wenn aussen sich eine wässrige Lösung befindet. Die innere Fläche der Membran wird mit konzentrierterer Lösung, die äussere mit einer verdünnteren Lösung leicht abgespült, und nach dem Einfüllen der konzentrierteren Lösung in das Präparat wird das ganze in die verdünntere Lösung eingetaucht. Die beiden Lösungen werden mit zwei KCl-Agarhebern nach den mit KCl gesättigten Kalomelelektroden abgeleitet. Das Potential wurde mit Hilfe des Kompensationsverfahrens in gewissen zeitlichen Intervallen (gewöhnlich 5 Minuten) gemessen. Die ausführliche Beschreibung der Anordnungen und besonders der Vernichtung der Diffusionspotentiale ist dieselbe, die ich schon in der vorigen Mitteilung gegeben habe. Das Konzentrationsverhältnis der beiden Lösungen war 10:1, gewöhnlich in 0,1 und 0,01 Äquivalentnormal.

Das Potential stellte sich verschieden schnell, aber meistens innerhalb 15 bis 30 Minuten ein. Das schon erreichte quasistationäre Potential hält sich ziemlich lange konstant, ja sogar 1 bis 2 Stunden lang, und zeigt erst dann Neigung sich allmählich wieder zu vermindern.

Zunächst sei die zeitliche Veränderung der Potentiale angegeben (Tabelle V). Aus dieser Tabelle sieht man zunächst, dass die zeitliche Änderung der Potentiale individuell etwas verschieden ist. Aber die erhaltenen konstanten Werte (quasistationäre Potentiale), die 15 bis 30 Minuten nach der Ansetzung zum Einstellen kommen, stimmen ziemlich gut überein: nämlich bei den Ketten von 0,01:0,001 n sind die Potentiale ungefähr 18,0 Millivolt, bei den Ketten von 0,1:0,01 n ca. 12,0 Millivolt und bei den Ketten von 1,0:0,1 n ca. 2,5 Millivolt.

Da das Diffusionspotential zweier KCl-Lösungen von ver-

TABELLE V.
Zeitliche Aenderung der Membranpotentiale.

Zeit der Ablesung nach An- setzung	KCl 0,01 n: 0,001 n			KCl 1,0 n: 0,1 n			KCl 1,0 n: 0,1 n		
	Mem- bran I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
sofort	20,0	26,5		20,3	17,0	14,5	6,5	5,5	4,0
5'	19,0	20,5	17,5	19,0	15,5	13,0	4,0	3,0	3,0
10'	19,0	18,0	19,0	18,5	15,0	12,0	2,8	2,5	2,5
15'	19,5	16,5	19,5	17,0	14,4	12,0	2,8	2,5	2,5
20'	19,5	15,0	20,7	16,0	14,0	12,0	2,8	2,5	2,5
25'		14,5	19,5	15,5	13,7	12,0	2,8	2,5	
30'		16,0	17,0	14,0	13,5			2,5	
35'		17,5	17,0	13,5	13,5				
40'		18,0	17,0	13,0	13,5		3,0		
45'		18,0	17,0	12,5	13,5				
50'		18,0		11,5					
55'		18,0		11,6					
60'				11,0					
65'				11,0					
70'				11,0					

schiedenen Konzentrationen praktisch null ist, so kann man hier eine Membranwirkung sicher annehmen.

Die zweite Versuchsreihe (Tabelle VI) soll zeigen, wie die zeitliche Umkehrbarkeit der Membranpotentiale sich zeigt. Diese wurde mittels KCl-Lösungen untersucht. Bei einer und derselben Hornhaut wurde einmal das Konzentrationsverhältnis der Berührungsflüssigkeiten von verdünnteren Lösungen über konzentrierte und von diesen wieder zu verdünnteren variiert, und andererseits wurde diese Reihenfolge etwas modifiziert, wie aus der Tabelle hervorgeht. Die Reversierbarkeit der Membranpotentiale ist, wie ersichtlich, recht befriedigend.

Vergleichen wir die in dieser Weise mit verschiedenen Elektrolytlösungen erhaltenen Potentiale mit den entsprechenden Diffusionspotentialen, so finden wir, dass der Sinn der Membraneffekte im grossen und ganzen derselbe wie der der vorher mit der

TABELLE VI.

Reversierbarkeit der Membranpotentiale an frischer Rinderhornhaut.

Art der Elektrolyte	Konzentrationsverhältnis in Normalität	EMK in Millivolt
KCl	0,01 : 0,001	17,0
	0,1 : 0,01	8,0
	1,0 : 0,1	2,5
	0,1 : 0,01	9,5
	0,01 : 0,001	19,0
KCl	0,1 : 0,01	13,5
	0,01 : 0,001	18,0
	1,0 : 0,1	2,5
	0,01 : 0,001	21,0
	0,1 : 0,01	12,0

Augapfelmethode erhaltenen Membraneffekte ist. Der Membraneffekt ist nämlich durchweg positiv, mit Ausnahme von AlCl_3 und HCl , bei denen er entschieden ins Negative umschlägt (Tabelle VII). Man erkennt ferner, dass das Potential, im Bereich der verwendeten Elektrolyten, um so positiver ist, je geringer die Elektrolytkonzentrationen sind.

Es scheint dennoch nicht ganz zutreffend, die in dieser Versuchsanordnung mit isolierter Hornhaut erreichten Resultate gleich mit den durch die Augapfelmethode erreichten zu identifizieren, weil die Hornhaut weder ganz homogen, noch beiderseits ganz symmetrisch gebaut ist. Vereinzelt wurden also die Messungen in umgekehrter Anordnung ausgeführt, indem man die innere, endotheliale Seite mit verdünnter Lösung und die äussere, epitheliale Seite mit konzentrierter Lösung sich berühren liess. Hierbei zeigte sich jedoch kein besonderer Unterschied, obwohl ihn die gerichtete Permeabilität, die vielfach von Mestrezat, Fischer u. a. angegeben wird, erwarten liess. In der Tabelle sind diese Werte in Klammern gesetzt.

TABELLE VII.

Membranpotentiale an isolierten, frischen Rinderhornhäuten.

Die in Klammern gesetzten Werte beziehen sich auf die dünnere Lösung.

Art der Elektrolyte	Konzentrations- verhältnis Innen : Aussen	EMK in Normalität	Mittel	Diffusions- potential	Membran- effekt.
KCl	0,01 : 0,001	19,5 18,0 21,0 17,0 19,0	19,0	0,4	12,4
	0,1 : 0,01	11,0 13,5 12,0 8,0 9,5	12,8		
	1,0 : 0,1	2,8 2,5 2,5	2,6		
	(0,01 : 0,1)	(8,0 10,5)			
NH ₄ Cl	0,01 : 0,001	25,0 20,0	8,0	-0,67	8,7
	0,1 : 0,01	6,5 9,5 7-8			
	1,0 : 0,1	2,5 2,5			
CaCl ₂	0,01 : 0,001	14,5 16,7	15,6	-19,9	13,4
	0,1 : 0,01	-7,0 -6,0	-6,5		
	1,0 : 0,1	-19,0 -18,0	-18,5		
	(0,01 : 0,1)	(-7,5 -7,0)			
MgCl ₂	0,01 : 0,001	36 20	-9,7	-22,5	12,8
	0,1 : 0,01	-8,5 -11,9 -9,5			
	1,0 : 0,1	-21,0			
BaCl ₂	0,1 : 0,01	-10,8 -7,0 -5,0	-7,6	-18,3	10,6
	(0,01 : 0,1)	(-7,0)			
KJ	0,01 : 0,001	32,0 33,0	14,6	-0,84	15,3
	0,1 : 0,01	22,0 11,0 13,5 12,0			
	1,0 : 0,1	-1,0			
AlCl ₃	0,1 : 0,01	-35,0 -30,5			
HCl	0,1 : 0,01 (0,01 : 0,1)	-6,5 -7,5 (-5,0 -5,5)	-7,0	38,0	-45,0

II. Versuche mit isolierten, formolisierten Hornhäuten.

Die Hornhaut hat im physiologischen Zustande einen ziemlich grossen Wassergehalt, nämlich ca. 76% (His und Leber). Sie

ist also im normalen Zustande schon gequollen. Überdies ist sie weiter quellbar, nicht nur in Wasser oder sehr verdünnten, sondern auch in konzentrierten Salzlösungen. Über den Zusammenhang von Quellung und Permeabilitätsverhältnis der Hornhaut liegt von E. P. Fischer eine schöne Arbeit vor. Nach ihm, der die Durchlässigkeit an Chlorionen untersuchte, verliert die Hornhaut die

TABELLE VIII.
Reversierbarkeit der Membranpotentiale an
formolisierten Rinderhornhäuten.

Art der Elektrolyte	Konzentrationsverhältnis in Normalität.	EMK in Millivolt.		
		I. Messung	II. Messung	III. Messung
KCl	1,0 : 0,1	2,0	3,0	
	0,1 : 0,01	8,5	9,0	11,0
	0,01 : 0,001	16,5	18,0	24,0
	0,1 : 0,01	8,7	10,0	11,5
	1,0 : 0,1	1,5	3,3	3,5
NaCl	1,0 : 0,1		-3,7	
	0,1 : 0,01	3,2	2,0	
	0,01 : 0,001	13,0	13,0	
	0,1 : 0,01	3,5	3,7	
	1,0 : 0,1	-2,7	-3,7	
LiCl	0,01 : 0,001	17,0		
	0,1 : 0,01	-3,0		
	1,0 : 0,1	-11,5		
	0,1 : 0,01	-3,5		
	0,01 : 0,001	16,0		
NH ₄ Cl	0,1 : 0,01	13,0	11,5	
	0,01 : 0,001	22,0	33,0	
	0,1 : 0,01	13,5	11,5	
BaCl ₂	1,0 : 0,1	-20,3		
	0,1 : 0,01	-16,0		
	0,01 : 0,001	-6,5		
	0,1 : 0,01	-17,0		
	1,0 : 0,1	-21,0		

Eigentümlichkeit der gerichteten oder auswählenden Durchlässigkeit, wenn sie quillt. Die Frage, wie die elektromotorische Kraft der Hornhaut von der Quellung abhängt, ist gewiss ein interessantes Thema, doch schien es uns im Gegenteil wichtiger zu sein, die Membranpotentiale der Hornhaut, welche derart angeordnet ist, dass sie durch irgend eine Salzlösung keine Quellung erleidet, festzustellen. Ich benutzte zu diesem Zweck mit Formol fixierte Rinderhornhäute.

Ausgeschnittene Rinderhornhaut wurde mit 10%igem Formol über 24 Stunden lang fixiert, 24 Stunden lang in fließendem, und dann in destilliertem Wasser gewaschen. Diese Membran wurde sanft mit Fliesspapier abgetrocknet und dann für die Versuche benutzt. Die Versuchsanordnung war ganz gleich wie die mit isolierten frischen Hornhäuten. Die Resultate sind folgende (Tabelle VIII und IX): Alkalichloride zeigen stets positiven Membraneffekt. Alle ungefähr von 10 Millivolt. Bei zweiwertigen Kationen Ca und Ba sind die Membraneffekte noch positiv, aber praktisch fast null. Bei dreiwertigem Al schlägt der Membraneffekt ins Negative um, und bei H-Ionen in Form von HCl ist der negative Membraneffekt auffallend.

TABELLE IX.
Konzentrationskette und Membraneffekt an
formolisierten Rinderhornhäuten.

Elektrolyte	Konzentrationskette 0,01 n: 0,1 n	Diffusionspotential	Membraneffekt
KCl	10,5	0,4	10,1
NaCl	3,2	-11,6	14,8
LiCl	-4,6	-18,8	14,2
NH ₄ Cl	12,3	-0,67	13,0
CaCl ₂	-14,6	-19,9	5,3
BaCl ₂	-16,3	-18,3	2,0
HCl	-15,0	38,0	-53,0
NaOH	8,0	-34,6	42,6

Überblicken wir diese Zahlen, so bemerken wir, dass diese im wesentlichen mit den Membraneffekten an der isolierten, frischen

Hornhaut und mit den durch die Augapfelmethode erhaltenen übereinstimmen. Die Reihe der Ionenwirkung ist hier aber am schönsten erkennbar, wie die Tabelle zeigt. Man wird hier auch wohl nicht fehlgehen, wenn man annimmt, dass die Quellung keinen beherrschenden Einfluss auf die elektromotorische Kraft der Hornhaut ausübt.

LITERATUR.

- Fischer, F. P. (1927): Arch. F. Augenheilk., 98, 41.
His (1856): Beiträge z. norm. und pathol. Histol. der Cornea. zit. nach
K. Steindorff (Handb. d. Biochem. d. Menschen u. d. Tiere., 4, 388,
1925).
Leber (1903): Die Zirkulations- u. Ernährungsverh. des Auges. Graefe-
Saemischs Handb. d. Augenheilk., 2, 2, 2, Aufl.
Mestrezat, W., Girard, P. et Morax, V. (1927): C. r. Soc. Biol.,
87, 227.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ELEKTRISCHE ERSCHEINUNGEN AN DER HORNHAUT.

III. Mitteilung: Elektrische Ladung der Hornhaut.

VON

KATSUZO HAYASHI.

*(Aus dem biochemischen Laboratorium und der Augenklinik der
medizinischen Fakultät zu Nagoya, Japan.)*

(Eingegangen am 20. August 1933)

Verschiedene Modellversuche, namentlich mit Kollodiummembran, Pergamentpapier, Paraffin und Gelatinemembran, führten uns betreffs der Entstehung der Membranpotentiale zu der Annahme, dass diese auf isolierte Durchlässigkeit der Anionen und Kationen zurückzuführen sind, und die letztere auch zumal durch die Ladung der Wand der Kapillaren beherrscht wird. Manche in der Natur vorkommenden Membranen sind negativ geladen und lassen mehr oder weniger Kationen besser durchpassieren als Anionen.

Dass die Elektrolyte einen grossen Einfluss auf die Ladung der Membran ausüben können, wurde schon viel diskutiert. Kollodiummembran kann aber nach Perrin, Gyemant und Loeb nie, selbst nicht in starker Säure, positiv geladen sein. Ebenso verhält sich Pergamentpapier. Man konnte nur an einer amphoteren Membran wie Gelatine positive Umladung der Membran durch gesteigerte H-Ionenkonzentrationen nachweisen (Höber, Mond, Fujita). Hardy erklärt auf Grund von Versuchen mit Globulin, dass die H- und OH-Ionen die Ladung der Eiweissionen beeinflussen, und Perrin übernahm die Vorstellung, dass die H- und OH-Ionen ihre elektrische Ladung an die Kolloidteilchen infolge ihrer relativ grossen Wanderungsgeschwindigkeit abgeben. Loeb ist aber der Ansicht, dass die elektrische Ladung der Kolloide durch elektrolytische Dissoziation

entsteht. Fügt man eine hinreichende Menge Säure zu der Lösung hinzu, so wird das Kolloidteilchen OH-Ionen im Überschuss abgeben und somit positive Ladung annehmen. Das Gegenteil tritt ein, wenn man die Lösung alkalisch macht.

Für die elektrische Ladung der Eiweissarten sind aber nicht nur H- und OH-Ionen massgebend, vielmehr üben auch andere Ionen Einfluss auf sie aus. Wenn Elektrolyte mit Eiweissarten in neutraler Lösung zusammentreffen, so entstehen Salzionen-Eiweissverbindungen, und die Eiweissarten können dabei gleichzeitig die Anionen und Kationen binden (Pauli, W.). Wenn die Eiweissarten sich in alkalischer Lösung befinden, so binden sie Kationen vorwiegend aus der Lösung zu Metallproteinat, z.B. Natriumproteinat, aus saurer Salzlösung binden sie aber Anionen im Vordergrund, z.B. Proteinchlorid, -sulfat usw. (Loeb).

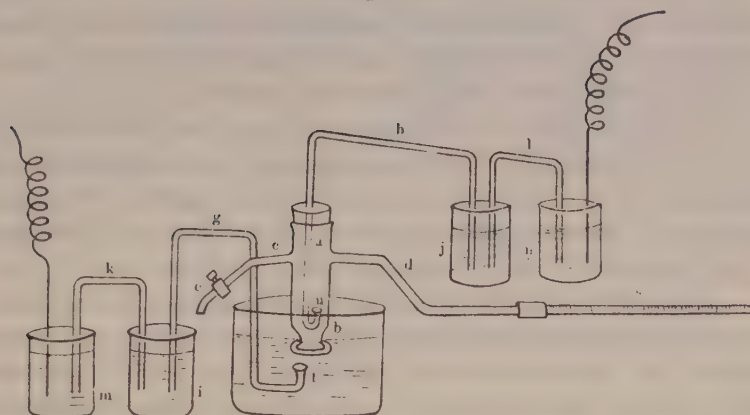
Wir müssen immerhin die Ladung der Membran als Folge der Ionenadsorption auffassen, sei es eine physikalische Adsorption wie bei Kollodiummembran, oder eine Art Vorstufenbildung zur chemischen Bindung wie bei Gelatine. Der Mechanismus der Adsorption ist für den Effekt belanglos. Wenn die Anionen stärker von der Membran adsorbiert werden, so lädt diese negativ, und umgekehrt.

Hornhaut besteht sowohl chemisch wie histologisch aus Eiweiss, und zwar hauptsächlich aus Kollagen. Über die elektrische Ladung der Hornhaut liegt aber bisher, soweit wir wissen, keine systematische Untersuchung vor. Es scheint mir also wichtig zu sein, diese grundlegende Eigenschaft der Hornhaut, und besonders den Einfluss verschiedener Ionen auf die Ladung der Hornhaut systematisch zu erforschen.

METHODIK.

Zur Messung der elektrischen Ladungen der Hornhaut wurde das Elektroendosmoseverfahren verwendet. Der hierfür gebrauchte Apparat ist unten abgebildet (Fig. 1.). Der Hauptteil des Apparates besteht aus dem Glaszylinder "a", dessen unterer Teil "b" sich etwas verjüngt. Über die nach unten gerichtete Öffnung des Glaszylinders "a" wird eine Hornhaut mit nach aussen gerichteter

Fig. 1.



Epithelienschicht gespannt, der überstehende Teil der Hornhaut nach oben umgeschlagen und dieser mit Baumwollzwirn an den Glaszylinder festgeschnürt, wobei eine Überspannung der Hornhaut tunlichst zu vermeiden ist. Die Lücken, die zwischen dem umgestülpten Teil der Hornhaut und der äusseren Zylinderwand entstehen könnten, werden mit Paraffineinguss wasserdicht geschlossen. Vom Glaszylinder zweigen nach links und rechts zwei Seitenröhren "c" und "d" ab. Das Ende der letzteren ist durch einen Gummischlauch mit dem beinahe in horizontaler Lage befindlichen Steigrohr "s" verbunden. Als Steigrohr bediente ich mich einer Kapillarpipette von 0,1 cm, welche in 0,001 cm graduiert ist. Das mit Glashahn versehene Rohr "c" dient dazu, um die definitive luftblasenfreie Erfüllung des ganzen Raumes mit zu untersuchender Flüssigkeit durch Ansaugen von "e" zu erleichtern. Das Gefäss "f" ist auch mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllt. Die zu untersuchende Elektrolytlösung muss im grossen Überschuss vorhanden sein, um die Verunreinigung durch Gewebsflüssigkeit usw. oder Konzentrationsveränderung durch Adsorption möglichst zu vermeiden. Die Glasröhren "g" und "h" sind mit 3%iger, mit KCl gesättigter Agargallerte gefüllt. Ihre unteren Enden (t, u) sind umgebogen, um eine Verunreinigung durch das herausdiffundierende KCl zu verhindern. Ihre anderen Enden tauchen in die Bechergläser (i, j),

die mit gesättigter KCl-Lösung gefüllt sind. Diese werden ferner durch andere KCl-Agarheber (k, l) in die Bechergläser (m, n) abgeleitet, die mit 10%iger Kupfersulfatlösung gefüllt werden, und die Kupferdrähte als Elektroden enthalten.

Nachdem sich ein konstantes Niveau im Steigrohr eingestellt hat, wird der Strom geschlossen; jede Minute wird die Stromstärke abgelesen, und die Stromrichtung alle 5–10 Minuten gewendet. Die angelegte Spannung war immer 100 Volt, und diese wurde mit Hilfe der Schalttafel genau reguliert.

Die Ausschläge des Niveaus bei Stromwendung waren ziemlich, aber nicht vollkommen, symmetrisch. Man musste bei der Stromleitung die Ausdehnung der Flüssigkeit, die durch Joule'sche Wärme hervorgerufen wird, berücksichtigen. Die Verschiebung des Meniscus im Steigrohr ist also die algebraische Summe der endosmotisch transportierten und der thermisch ausgedehnten Flüssigkeitsmenge. Immerhin kann die letztere praktisch vernachlässigt werden, da die Ausschläge beiderseits ziemlich symmetrisch sind.

Der wahre Wert der endosmotischen Verschiebung wird dadurch erhalten, dass das Mittel aus den Ablesungen nach mehrmaligen Stromwendungen gezogen wird. Hierfür wurde die Verschiebung des Meniscus jeweils genau nach einer Minute abgelesen. Dies wurde unter jedesmaliger Stromwendung einige Male wiederholt, und das Mittel aus mehreren Ablesungen als definitiver Wert genommen. Der Versuch wurde meist innerhalb von 20 bis 30 Minuten nach der Zusammensetzung des Apparates beendet.

Der Potentialunterschied der Kapillarenwand gegen die Lösung oder das Adsorptionspotential ζ im Sinne von Freundlich kann nach der Gleichung von Helmholtz und Smoluchowski berechnet werden.

$$\zeta = \frac{4\pi y \lambda v}{i \cdot D} 90,000 \text{ Volt}$$

wo η = Viskosität, λ = spezifische Leitfähigkeit der Lösung, V = pro der Natur vorkommenden Membranen sind negativ geladen und entstehen k*nnnten, werden mit Paraffineinguss wasserdicht ge-

Sekunde transportierte Wassermenge in ccm, i =Stromstärke in Ampère, D =Dielektrizitätskonstante des Wassers.

Auf die Feststellung des Adsorptionspotentials verzichtete ich, da die spezifische Leitfähigkeit der Lösungen in Kapillarkanälen nicht messbar war. Nur als angenähertes relatives Mass für das Adsorptionspotential kann die elektroendosmotische Verschiebung betrachtet werden. Die Konzentrationen der hierfür benutzten Elektrolytlösungen wurden auf den Bereich von 0,01 bis 0,5 Äquivalentnormal beschränkt. Meist wurden die Messungen sofort nach Eintauchen der Hornhaut in die Lösung angefangen. In vereinzelten Fällen wurden die Messungen auch erst einige Stunden nach dem Eintauchen in die Lösung, wobei die Adsorption besser zustande gekommen sein sollte, ausgeführt. Im Beginn der Messung, wo der Adsorptionsvorgang noch nicht aufgetreten ist, schwankt die Meniskusverschiebung ziemlich unregelmässig. Also sollte die eigentliche Ablesung erst beginnen, nachdem der Strom einige Minuten lang unter mehrmaligen Stromwendungen durchgeschickt worden ist.

RESULTATE.

A. Versuche mit frischen Rinderhornhäuten.

Die Resultate sind in Tabelle I zusammengefasst. Die erste Spalte enthält die Arten der Elektrolyten, die zweite die Konzentrationen in Äquivalentnormal, die dritte die Zeit der Messung nach Eintauchen der Hornhaut in die Lösung, die vierte die Stromintensität in Ampère, die fünfte den Ladungssinn und die sechste die pro Sekunde transportierte Wassermenge in ccm.

Gegen destilliertes Wasser lässt sich eine Ladung der Kapillarkanälen nicht nachweisen, wenn man sofort oder sogar nach 1 Stunde langem Eintauchen ins Wasser misst. Erst nach 6 Stunden langem Eintauchen der Hornhaut in das Wasser wurde die negative Ladung erwiesen. Sicherlich handelt es sich hier in den Kanälen nicht um reines Wasser, sondern um sehr verdünnte Gewebsflüssigkeit.

Die Versuche mit Ringerscher Lösung zeigten eine kleine, doch merkbare negative Ladung der Membran, und daraus kann man

TABELLE I.

Versuche mit frischen Rinderhornhäuten.

Elektrolyte	Konzentration in Aequivalent-normal	Beginn der Messung nach Eintauchen in die Lösung	Stromintensität in Ampère	Ladungs-sinn	Pro Minute transportierte Wassermenge in ccm
H ₂ O		sofort	0,00047	±	0,000
		nach 1 Stunde	0,00043	±	0,000
		nach 6 Stunden	0,00093	—	0,061
KCl	0,01	sofort	0,00493	—	0,042
	„	nach 1 Std.	0,00509	—	0,138
	„	nach 2,5 Std.	0,00634	—	0,202
	0,1	sofort	0,0114	—	0,021
	„	nach 2 Std.	0,0100	—	0,005
	0,2	sofort	0,01117	—	0,035
	„	nach 1 Std.	0,01733	—	0,027
	„	nach 4 Std.	0,01163	—	0,027
	1,0	nach 1 Std.	0,01300	—	0,004
LiCl	0,1	sofort	0,01004	—	0,053
	„	nach 1 Std.	0,01013	—	0,111
	„	nach 6 Std.	0,0083	—	0,028
NaCl	0,01	sofort	0,0055	—	0,051
	0,1	sofort	0,0078	—	0,022
	1,0	sofort	0,0085	—	0,002
NH ₄ Cl	0,01	sofort	0,0018	—	0,021
MgCl ₂	0,01	sofort	0,0036	—	0,027
	0,1	sofort	0,0075	—	0,020 (→0)
	0,5	sofort	0,0079	±	0,000
CaCl ₂	0,01	nach 6 Std.	0,0040	—	0,083
	0,1	sofort	0,011	—	0,018
	„	sofort	0,0097	—	0,0098
	„	nach 1,5 Std.	0,0097	±	0,000
	„	nach 5 Std.	0,0087	—	0,012

Elektrolyte	Konzentration in Äquivalent-normal	Beginn der Messung nach Eintauchen in die Lösung	Stromintensität in Ampère	Ladungs-sinn	Pro Minute transportierte Wassermenge in ccm.
BaCl ₂	0,01	nach 2 Std.	0,0031	—	0,020
	0,1	über Nacht	0,0068	—	0,005
	„	sofort	0,0070	—	0,011
	„		0,0066	—	0,009
Cu(NO ₃) ₂	0,1	sofort	0,0070	+	0,017
	„	nach 1 Std.	0,0069	+	0,018
CeCl ₃	0,01	nach 45 Std.	0,0017	+	0,012
	„	nach 1 Std.	0,0038	+	0,046
	„	sofort	0,0060	+	0,047
AlCl ₃	0,01	sofort	0,0040	+	0,082
	0,1	sofort	0,0093	+	0,067
Th(NO ₃) ₄	0,01	sofort	0,0045	+	0,088
HCl	0,001	sofort	0,0026	+	0,038
	0,01	sofort	0,0058	+	0,052
	0,1	sofort	0,0098	+	0,033
Ringersche Lösung			0,0072	—	0,018
			0,0050	—	0,013
			0,0130	—	0,046
KJ	0,01	sofort	0,0047	—	0,069
	„	sofort	0,0042	—	0,063
	0,1	sofort	0,0070	—	0,010
	„	sofort	0,0072	—	0,024
KSCN	0,01	sofort	0,0040	—	0,044
K ₂ SO ₄	0,001	nach 2 Std.	0,0038	—	0,056
	0,01	sofort	0,0044	—	0,055
	„	nach 2 Std.	0,0080	—	0,062
	„	über Nacht	0,0102	—	0,045
	0,1	sofort	0,0065	—	0,020
	0,5	sofort	0,0068	—	0,004

Elektrolyte	Konzentration in Äquivalent-normal	Beginn der Messung nach Eintauchen in die Lösung	Stromintensität in Ampère	Ladungssinn	Pro Minute transportierte Wassermenge in ccm.
K_3FeCy_6	0,001	sofort	0,0020	—	0,088
	„	über Nacht	0,0050	—	0,019
	0,01	sofort	0,0050	—	0,086
	„	nach 2 Std.	0,0084	—	0,098
	0,1	sofort	0,0076	—	0,031
	„	nach 3 Std.	0,0097	—	0,076
K_4FeCy_6	0,001	sofort	0,0019	—	0,022
	„	nach 1 Std.	0,0036	—	0,057
	0,01	sofort	0,0035	—	0,059
	„	nach 1 Std.	0,0044	—	0,115
	0,05	sofort	0,0056	—	0,060
	„	nach 1 Std.	0,0055	—	0,074

folgern, dass die Ladung der Hornhaut in der Natur schwach negativ ist.

Um den Einfluss jedes einzelnen Ions auf die elektrische Ladung der Membran zu erforschen, wurden in den benutzten Elektrolytlösungen bei gleichem Anion (Cl) nur die Kationen variiert und bei gleichem Kation (K) nur die Anionen. Von den Chloriden von Alkalimetallen wurden K, Na, NH_4 und Li angewendet. KCl, welches in der Konzentration von 0,01, 0,1 und 0,2 Äquivalent-normal benutzt wurde, gibt jedenfalls ein negatives Potential der Kanälchenwände. LiCl in 0,1 n verhält sich auf dieselbe Weise. Bei den Chloriden von zweiwertigen Kationen, d. h. $MgCl_2$, ist die Ladung in entsprechenden Konzentrationen ebenfalls negativ. Allein das Cu-Ion in Form von $Cu(NO_3)_2$ in der Konzentration von 0,1 n dreht die Ladung deutlich ins Positive um. Chloride der dreiwertigen Al und Ce laden die Hornhaut positiv in der Konzentration von 0,01 n sowie 0,1 n. Für das vierwertige Th, welches auch in Form von Nitrat angewendet wurde, kommt die Umladung entschieden ins Positive sogar in der Konzentration von 0,01 n

TABELLE II.
Versuche mit formolisierten Kaninchen-Hornhäuten.

Elektrolyte	Konzentration in Äquivalent-normal	Beginn der Messung nach Eintauchen in die Lösung	Stromintensität in Ampère	Ladungs-sinn	Pro Minute transpor-tierte Wassermenge in ccm
H ₂ O		sofort	0,00017	—	0,002
„		nach 2 Std.	0,00174	—	0,015
Ringersche Lösung		nach 1 Std.	0,0070	—	0,006
AlCl ₃	0,002	sofort	0,0029	+	0,020
Th(NO ₃) ₄	0,002	sofort	0,0030	+	0,019
HCl	0,002	sofort	0,0039	+	0,011
KCl	0,002	sofort	0,0026	—	0,009
CuSO ₄	0,002	sofort	0,0034	+	0,007

zustande. Ferner wird die Umladung erzielt durch das H-Ion, das in Form von HCl angewendet wurde. Selbst 0,001 n von HCl wirkt stark positivierend.

Die Hornhaut wird also durch Chloride von Cu⁺⁺, Ce⁺⁺⁺, Al⁺⁺⁺, Th⁺⁺⁺⁺ und H⁺ positiv umgeladen, und diese Umladung kommt wahrscheinlich teilweise dadurch zustande, dass die Wand der Kapillarkanäle in der Hornhaut diese Kationen adsorbiert oder chemisch verbindet, d. h. dass Metallproteinate, z. B. Al-Proteinate, Thoriumproteinate usw., entstehen. Da wir aber wissen, dass manche Salze von mehrwertigen Kationen, wenn sie in Wasser gelöst sind, hydrolytisch gespalten werden und beträchtliche Säurereaktion zeigen, scheint es nicht richtig, diese Umladung ausschliesslich auf die Adsorption der Metallkationen zurückzuführen. Vielmehr wäre der Gedanke noch naheliegender, dass die H-Ionen, welche bei der Hydrolyse abgespalten werden, sich hierbei auch an der Umladung der Membran beteiligen. Dieses Verhältnis ist gegenwärtig noch nicht ganz geklärt. Soviel kann man aber sicher sagen, dass die H-Ionen jedenfalls am stärksten adsorbierbar sind.

Die Variation der Anionen wurde in Form ihrer Kaliumsalze nur in einigen Arten durchgeführt. 0,01 n KJ wirkt stark

negativierend, während 0,1 n KJ weniger stark negativiert. Bei K_2SO_4 sieht man, dass die negativierende Wirkung mit steigender Konzentration der Lösung deutlich fällt, also von 0,01 n zu 0,1 n und zu 0,5 n. Bei der letzten Konzentration ist die Ladung innerhalb der Fehlergrenze null. K_3FeCy_6 lädt die Membran in verdünnten Lösungen (0,001 n, 0,01 n) stark, bei konzentrierten (0,1 n) aber viel schwächer negativ. Wie erwartet ist das Potential bei K_4FeCy_6 stark negativ. Doch ist das Konzentrationsverhältnis nicht eindeutig unterscheidbar. Die Messung nach 1 Stunde langem Eintauchen der Hornhaut in die K_4FeCy_6 -Lösung zeigt jedenfalls eine stärkere Negativierung, welche leicht begreiflich ist, da die Stromintensität bei ihnen keinen bedeutenden Unterschied gegen die anderen Konzentrationen zeigt.

B. Versuche mit formolisierten Kaninchenhornhäuten.

Die Hornhäute von durch Verblutung getöteten Kaninchen wurden mehrere Tage in 10%iger Formollösung fixiert, mit fließendem Wasser gründlich gespült und weiter mit destilliertem Wasser tagelang gewaschen. Dann wurde die Messung auf ganz dieselbe Weise wie bei den obigen Versuchen mit Rinderhornhaut ausgeführt. Die Einstellung der konstanten Stromverschiebung wurde immer ziemlich schnell erzielt. Tabelle II zeigt die Versuchsergebnisse. In reinem Wasser fand ich eine negative Ladung der Hornhaut. In Ringerscher Lösung, in der die Hornhaut $2\frac{1}{2}$ Stunden lang eingetaucht war, zeigt sich die Ladung sicher negativ, ebenso auch in KCl-Lösung in der Konzentration von 0,002 n. Jeder einzelne Elektrolyt wurde hier nur in einer einzigen Konzentration angewendet, 0,002 Äquivalentnormal. Einwertige H-Ionen in Form von HCl und zweiwertige Cu-Ionen in Form von $CuSO_4$ drehen die Ladung auffallend ins Positive um, und das dreiwertige Al-Ion in Form von $AlCl_3$, sowie vierwertige Th-Ionen in Form von $Th(NO_3)_4$ geben die positive Ladung am stärksten.

ZUSAMMENFASSUNG.

A. Bei frischer Rinderhornhaut:

1. Die elektrische Ladung der frischen Rinderhornhaut gegen

reines Wasser lässt sich schwer nachweisen. Wenn sie doch einmal erkennbar wird, so erscheint sie negativ.

2. In Ringerscher Lösung für Warmblüter ist der Ladungssinn der Hornhaut negativ.

3. Die Chloride der Alkalimetalle K, Li, Na sowie die Erdalkalimetalle Mg, Ba und Ca geben sämtlich eine negative Ladung.

4. Die Nitrate des Cu^{++} und Th^{++++} und die Chloride des Ce^{++} und Al^{+++} laden die Hornhaut entschieden positiv, selbst in kleinen Konzentrationen.

5. Das H^{+} -Ion nimmt eine Sonderstellung ein dadurch, dass es die Membran stark positiviert, sogar in sehr verdünnter Lösung.

6. Variiert man die Anionen bei gleichem Kation K, so sieht man doch jedenfalls die negative Ladung der Membran. Stärkere Negativierung durch mehrwertige Anionen als durch einwertige kann aber nicht konstatiert werden.

B. Bei formolisierter Kaninchenhornhaut:

1. Sowohl gegen reines Wasser wie gegen Ringerlösung lässt sich eine negative Ladung nachweisen.

2. H^{+} , Cu^{++} , Al^{+++} und Th^{++++} geben eine deutlich positive Ladung der Membran.

LITERATUR.

- Fujita, A. (1925/26): Biochem. Zeitschr., **158**, 11; **162**, 245; **159**, 370; **179**, 18.
 Geymant, A. (1921): Kolloid-Z., **28**, 103.
 Hardy, W. B. (1903): Journal of Physiol., **29**, 29.
 Hayashi, K. (1926): Kolloid-Z., **39**, 208.
 Höber (1924): Zeitschr. f. physik. Chem., **110**, 142.
 Loeb, J. (1923–24): J. Gen. Physiol., **6**, 105.
 Loeb, J. (1924): Die Eiweisskörper und die Theorie der kolloidalen Erscheinungen, Berlin.
 Michaelis, L. und Fujita, A. (1925): Biochem. Zeitschr., **158**, 28; **161**, 47; **164**, 23.
 Michaelis, L. und Dokan, S. (1925): Biochem. Zeitschr., **162**, 258.
 Michaelis, L. und Hayashi, K. (1926): Biochem. Zeitschr., **173**, 411.
 Michaelis, L. (1925–26): J. Gen. Physiol., **8**, 33.
 Mond (1924): Pflügers Arch., **203**, 247.
 Pauli, W. (1920): Kolloidchemie der Eiweisskörper, Dresden und Leipzig.
 Perrin, J. (1904/05): J. Chem. Phys., **2**, 601; **3**, 50.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ELEKTRISCHE ERSCHEINUNGEN AN DER HORNHAUT.

IV. Mitteilung:

Der Isoelektrische Punkt der Hornhaut und Schlussbetrachtung.

VON

KATSUZO HAYASHI.

*(Aus dem biochemischen Laboratorium und der Augenklinik der
medizinischen Fakultät zu Nagoya, Japan.)*

(Eingegangen am 20. August 1933)

Im vorangehenden Kapitel wurde die elektrische Ladung der Hornhaut gegen wässrige Lösungen verschiedener Elektrolyten durch Elektroendosmoseverfahren untersucht. Die Ergebnisse sind wie folgt: Die Hornhaut lädt sich gegen Neutralsalz- und Ringersche Lösung stets negativ, gegen $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$, CeCl_3 , AlCl_3 und HCl jedoch deutlich positiv. Also kann die Hornhaut umgeladen werden. Bei unseren früheren Untersuchungen mit Kollodium usw. sind wir zu folgender Annahme gekommen: Die negative Ladung der Membran entsteht dadurch, dass sie Anionen adsorbiert. Wenn nun an beiden Seiten der Membran Elektrolytlösungen verschiedener Konzentration sich befinden, so dürften hier in den Kanälchen der Membran die Anionen derselben zum Teil an der Wand fixiert werden. Also wird wegen der elektrostatischen Abstossung die durchschnittliche Bewegung der Anionen relativ gegenüber der der Kationen verlangsamt werden. In genauer Weise wurde diese Theorie von Michaelis entwickelt.

Wenn diese Vorstellungen als richtig angenommen werden, dann müsste man bei Hornhaut, die eine amphotere Membran ist, erwarten, dass diese im isoelektrischen Punkte keinen Membraneffekt ausübt. D.h. dass zwei Elektrolytlösungen, welche durch eine isoelektrische Membran getrennt sind, denselben Potential-

unterschied zeigen wie bei freier Berührung; dass, wenn die Membran negativ geladen ist, die relative mittlere Beweglichkeit der Anionen vermindert würde, und dass, wenn die Membran positiv geladen, die Permëierung der Kationen relativ vermindert werden dürfte. Um dies zu beweisen, habe ich die folgenden Untersuchungen ausgeführt.

Da wir schon gesehen haben, dass die H-Ionen am stärksten die Umkehrung der Membranwirkung hervorrufen, und dass die Konzentration dieser am günstigsten abstufbar ist, soll zunächst geprüft werden, bei welcher H-Ionenkonzentration diese Umkehrung eintritt. Die Versuchsanordnung ist ganz dieselbe wie bei der Messung der Potentiale in der Konzentrationskette (Fig. 1 der I. Mitt.). Als Berührungsflüssigkeit wurde hier Acetatpufferlösung angewendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle I

TABELLE I.

Zusammensetzung der Puffer	PH	EMK	Mittel	Konzentrations- effekt	Diffusions- potential	Membran- effekt
0,01 Na. acetat	8,5	7,5 13,5 12,5	11,2	17,0	7,5	9,5
0,1 Na. acetat	"	-5,5 -6,0 -5,7	-5,8			
0,01 Na. acetat 0,01 Essigsäure	4,7	5,0 5,1 5,0	5,0	8,5	7,2	1,3
0,1 Na. acetat 0,1 Essigsäure	"	-3,5 -3,5	-3,5			
0,01 Na. acetat 0,03 Essigsäure	4,3	-5,5 -5,7	-5,6	-1,6	6,9	-8,5
0,1 Na. acetat 0,3 Essigsäure	"	-4,0 -4,0	-4,0			
0,01 Na. acetat 0,08 Essigsäure	3,8	-10,3 -11,5	-10,9	-6,1	6,5	-12,6
0,1 Na. acetat 0,8 Essigsäure	"	-4,4 -5,3	-4,8			

zusammengestellt. Die erste Spalte enthält die Mischungsweise der Acetatpufferlösungen, die zweite die PH-Werte. Die PH-Messungen in den Tabellen wurden elektrometrisch ausgeführt. Zu 0,01 und 0,1 äquivalentnormaler Natriumacetatlösung wurde eine bestimmte Menge Essigsäure hinzugefügt, derart, dass beide Lösungen, welche die Konzentrationskette bilden, gleiches PH

hatten; diese Essigsäuremenge wurde dann in verschiedenen Versuchen variiert. Von 2 oder 3 Messungen des Potentialunterschiedes der Acetatpufferlösung gegen Hornhaut, die im quasistationären Zustande eine gute Übereinstimmung zeigten, wurde das Mittel genommen (Spalte 3), und daraus wurde wieder der Konzentrationseffekt von der Zehnerpotenz bei gleichem P_{H_2} berechnet (Spalte 4).

Wenn man zwei verschieden konzentrierte Lösungen von Natriumacetat sich berühren lässt, so sieht man, dass das Diffusionspotential durch Zusatz von Essigsäure keine merkliche Veränderung erleidet; denn die Essigsäure, die eine schwache Säure ist, ruft in der Acetatpufferlösung nach dem Massenwirkungsgesetz nur eine verschwindend kleine Konzentration von H -Ionen gegenüber der der Na -Ionen hervor. Bei Berührung mit der Hornhaut zeigte dagegen der Konzentrationseffekt dieser Lösungen starke Abhängigkeit vom Zusatz der Essigsäure, also von der Konzentration der H -Ionen. Während das Diffusionspotential zwischen zwei reinen Natriumacetatlösungen, das bei einem Konzentrationsverhältnis 0,01:0,1 n 7,5 Millivolt für die verdünntere Lösung beträgt, durch den Zusatz von gleich konzentrierter Essigsäure, d. h. beim P_{H_2} 4,7, andeutungsweise sinkt, also zu 7,2 Millivolt, zeigt der Konzentrationseffekt bei reinen Acetatlösungen deutliche Positivierung, nämlich 17,0 Millivolt und beim P_{H_2} 4,7 deutliches Absteigen zu 8,5 Millivolt. Bei weiterem Zusatz von Essigsäure vermindert sich der Konzentrationseffekt; nämlich bei P_{H_2} 4,3 wird er innerhalb der Fehlergrenze fast Null, und bei P_{H_2} 3,8 kehrt die Wirkung um, $-6,0$ Millivolt. Wenn man mit dem Diffusionspotential vergleicht, bemerkt man, dass der Konzentrationseffekt bei P_{H_2} 4,7 innerhalb der Fehlergrenze dasselbe Verhalten zeigt wie das Diffusionspotential. Bei der Konzentrationskette mit reinen Natriumazetatlösungen, also bei P_{H_2} 8,5, ist der Konzentrationseffekt gegenüber dem Diffusionspotential um 10 Millivolt positiviert. Dagegen ist bei P_{H_2} 4,3 der Konzentrationseffekt von 8,5 Millivolt negativierter als bei der freien Diffusion, und bei P_{H_2} 3,8 ist er gegenüber der freien Diffusion noch stärker negativiert.

DER ISOELEKTRISCHE PUNKT DER HORNHAUT NACH DEM
ELEKTROENDOSMOSEVERFAHREN.

Wenn unsere Annahme zu Recht besteht, so müsste der isoelektrische Punkt der Hornhaut bei ca. pH 4,7 liegen. Ausser dem Befund Gullottas über den isoelektrischen Punkt der Linse, pH 4,0, hat Baurman schon den isoelektrischen Punkt des Glaskörpers bei pH 4,4 festgestellt. Ferner hat Matsuoka den isoelektrischen Punkt des Kaninchenkammerwassers beim pH 4,7 und denjenigen des Glaskörpers beim pH 6,7–7,2 gefunden. Leider liegt bisher, soweit mir bekannt, keine Literaturangabe über den isoelektrischen Punkt der Hornhaut vor. Diese grundlegende Eigenschaft der Hornhaut festzustellen, scheint mir also nötig.

Als Methode wählte ich zunächst das Elektroendosmoseverfahren. Die exstirpierten frischen Rinderhornhäute wurden unter denselben Versuchsanordnungen wie in der vorangehenden Mitteilung untersucht. Als Strömungsflüssigkeit wurden Essigsäure-Natriumacetatpufferlösungen von pH 8,5 bis 3,4 angewendet. Diese Untersuchungen ergaben die in Tabelle II angeführten Resultate. Die erste Spalte enthält die Essigsäure-Natriumacetat-

TABELLE II.
Der Isoelektrische Punkt der Hornhaut nach dem
Elektroendosmoseverfahren.

Elektrolyte	pH	Strom- intensität in MA.	Spannung in Volt	Ladungs- sinn	Pro Minute transportierte Wassermenge in 0,0001 ccm
0,01 n Na. acetat	8,5	5,0	100	—	65
„ + 0,0025 n Essigsäure	5,3	6,2	100	—	75
„ + 0,005 n „	5,0	7,5	100	—	123
„ + 0,01 n „	4,7	6,0	100	—	60
„ + 0,02 n „	4,4	8,0	90	—	48
„ + 0,03 n „	4,3	8,2	100	+	1,5
„ + 0,04 n „	4,1	7,8	85	+	23
„ + 0,08 n „	3,8	6,0	100	+	28
„ + 0,16 n „	3,5	8,0	100	+	78
„ + 0,01 n „	3,4	6,3	100	+	55

gemische, die zweite die P_{II} und die dritte die Stromintensität in Ampère.

Überblicken wir die Tabelle, so finden wir, dass der Ladungssinn der Hornhaut bei P_{II} 4,3 praktisch null ist, während bei grösserem P_{II} die Membran überall negativ, bei kleinerem P_{II} dagegen positiv geladen ist.

Nach dem Abschluss der Untersuchung ist nebenbei zu bemerken, dass die Hornhaut bei P_{II} 4,3 in ihrer ganzen Schicht weisslich getrübt, bei P_{II} 4,4 die Epithelien weisslich getrübt waren, während bei anderen P_{II} sie ziemlich klar geblieben waren. Dies entspricht auch dem von Gullotta an der Linse durch Quellungs-methode bemerkten Befund.

Auf die Frage, wie die Umladung der Membran zustande kommt, ist einfach zu antworten: Von welcher Konzentration auch die Na-Ionen sein mögen, dürften sie jedoch niemals eine positive Ladung der Membran herbeiführen. Allein eine sehr geringe Zahl von H-Ionen kann diese Membran positiv umladen.

Mit Elektroendosmoseverfahren wird also der isoelektrische Punkt der Hornhaut bei P_{II} 4,3 festgestellt.

DER ISOELEKTRISCHE PUNKT DER HORNHAUT NACH QUELLUNGSVERSUCH.

Ferner habe ich den isoelektrischen Punkt der Hornhaut durch Quellungsversuch untersucht. Diese Methode beruht darauf, dass im isoelektrischen Punkt die Quellung Minimumwert hat (Loeb). Zu diesem Zweck wurden von einer Hornhaut mehrere Stücke möglichst von gleichem Volumen herausgeschnitten und in die Versuchslösungen eingetaucht. Nach 24 Stunden wurde die Gewichtszunahme gemessen. Wie schon oben erwähnt, hat die Hornhaut unter physiologischen Verhältnissen einen ziemlich grossen Wassergehalt, und selbst in sehr konzentrierten NaCl-Lösungen quillt sie ausgesprochen. Es wurde hierbei grösste Sorge getragen, um Fehler durch Druck, Verdunstung usw. zu vermeiden. Alles Material wurde in kühler Feuchtkammer aufbewahrt. Das Hornhautstück wird zunächst nur kurz mit der zu untersuchenden Pufferlösung benetzt und sorgfältig abgewischt (ohne Druck

auszuüben). Nachdem sein Gewicht festgestellt ist, wird es in einen sehr grossen Überschuss der Lösung eingetaucht. Der Überschuss der Lösung muss so gross sein, dass ihre Konzentration durch die Adsorption usw. nicht messbar verändert wird. Es wurden 0,2 bis 0,3 g Hornhautstückchen in 50 ccm Lösung eingetaucht. In der Tat wurde nach dem Herausnehmen der Stückchen keine merkliche P_H -Veränderung der Lösung, in der sie eingetaucht waren, konstatiert.

Tabelle III zeigt die Versuche mit Azetatpuffer. Der Quellungsgrad der Hornhaut in der Azetatpufferlösung ist im allgemeinen so klein, dass man einen sicheren Schluss daraus nicht ziehen kann. Es zeigen jedoch die mehrmals wiederholten Untersuchungen immer dasselbe Resultat: Das Minimum der Volumveränderung zeigt sich immer bei P_H 4,2. Der isoelektrische Punkt scheint also hierbei ungefähr in demselben P_H 4,2 zu liegen.

TABELLE III.
Der Isoelektrische Punkt bestimmt durch Quellungsversuch.

Zusammensetzung der Puffer		P_H	Gewichtszunahme in %
Essigsäure in Mol	Na. acetat in Mol		
0,185	0,015	3,6	6,13
0,176	0,024	3,8	4,95
0,164	0,036	4,0	4,93
0,147	0,053	4,2	0,74
0,126	0,074	4,4	4,05
0,080	0,120	4,8	9,12

Mit den Pufferlösungen von Sek. Phosphat-Citronensäure und Glykokoll-NaOH wurden noch weitere Gebiete des P_H untersucht (Tabelle IV). Hierbei treten die Volumveränderungen noch auffallender als bei den Azetatpufferlösungen hervor. Die Minimumbildung zeigte sich bei P_H 4,4. Der isoelektrische Punkt liegt also in ca. P_H 4,4.

Aus den obigen Versuchen erkennen wir, dass der isoelektrische Punkt der Hornhaut nach dem Elektroendosmoseverfahren in der Gegend von P_H 4,3 und nach dem Quellungsversuch

TABELLE IV.

Der Isoelektrische Punkt nach dem Quellungsversuch.

Zusammensetzung der Puffer		PH	Gewichtszunahme in %
m/5 Sek. Phosphat	m/10 Citronensäure		
14,25	35,75	3,4	87,14
16,10	33,90	3,6	81,85
17,75	32,25	3,8	79,31
19,28	30,72	4,0	50,72
20,70	29,30	4,2	41,80
22,05	27,95	4,4	30,07
23,38	26,62	4,6	42,30
25,75	24,25	5,0	75,10
27,87	22,13	5,4	96,17
31,57	18,43	6,0	95,93
41,18	8,82	7,0	108,49
48,63	1,37	8,0	109,48
m/10 Glykokoll	m/10 NaOH		
45,0	5,0	9,0	106,32
30,0	2,0	10,0	112,75

im Bereich von PH 4,2 oder 4,4 liegt.

Im grossen und ganzen stimmt also dieser Befund mit dem Neutralpunkt oder Umkehrpunkt für die Membranwirkung überein. Die Differenz von einigen Dezimalen zwischen ihnen beruht wohl auf dem Unterschied der Versuchsmethodik. Es zeigt sich somit, dass man den isoelektrischen Punkt der Hornhaut auch durch Messung des Umkehrpunktes der Membranwirkung annähernd bestimmen kann.

SCHLUSSBETRACHTUNGEN:

Wenn man die verschiedenen Untersuchungen über Membranpotentiale in Betracht zieht, so scheint es, dass die Theorien über diese Potentiale in drei Arten geteilt werden können: 1) Phasengrenz-, 2) Diffusions- und 3) Donnanpotentiale.

Die erste Theorie setzt voraus, dass die Potentialdifferenz der

beiden Seiten der Membran gegen die benachbarten Lösungen aus Potentialsprung auf der Grenze zweier Phasen entsteht, von denen die eine die Lösung und die andere die Membransubstanz ist, die als Lösungsmittel für Elektrolyte dient. Die Differenz der Verteilung einer Art von Ionen zwischen zwei Lösungsmitteln ruft den Potentialunterschied hervor. Diese Theorie, die erst von Nernst entwickelt und später theoretisch und experimentell von Haber bearbeitet wurde, wurde von Beutner auf biologische Membranen angewendet. Beutner, indem er Potentiale der pflanzlichen Gewebe untersuchte, hat gefunden, dass organische Gewebe ebenfalls einen Konzentrationseffekt zeigen, und zwar in derselben Richtung wie ein säurehaltiges "Oel", und erklärt den Konzentrationseffekt durch Phasengrenzkräfte, wobei er annimmt, dass überhaupt wasserunlösliche Bestandteile des Gewebes, und zwar darin enthaltene Fette oder fettähnliche Substanzen, elektromotorisch wirksam sind.

Hierzu ist jedoch zu sagen, dass das Vorhandensein von Fetten in der Membran nicht unbedingt notwendig ist; denn Höber, Vorschütz, Natansen, Matsuo und Mond haben gezeigt, dass man mit eiweissartigen Membranen dieselben elektromotorischen Effekte erhält. Die Höbersche Schule zeigt sogar, dass es nach dem jetzigen Stande der Forschung nicht möglich ist, die Salzruhestrome als Oelketten im Sinne Beutners aufzufassen.

Die zweite Theorie schreibt die Potentialdifferenzen, die durch die Membranen hervorgerufen werden, der Differenz in der Geschwindigkeit der Ionen zu, die durch die Membran diffundieren. Nach dieser Theorie zeigt sich in der Membrangrenze keine abrupte Veränderung der Potentiale, sondern von einer Grenze zur anderen eine langsame Veränderung, wie dies beim Flüssigkeitskontaktpotential der Fall ist, wenn zwei verschiedene Elektrolytlösungen sich direkt berühren, und durch Diffusion zwischen den zwei Lösungen eine Zone von graduellem Übergang entsteht. Die zweite Theorie ist also die des Diffusionspotentials. Diese Theorie ist zuerst von Ostwald begründet und experimentell sowie theoretisch von Michaelis und seinen Schülern mit verschiedenen Modellversuchen ausgearbeitet worden. Michaelis entwickelt diese Theorie

folgendermassen: Es mag eine Hypothese aufgestellt werden, dass bei den meisten in der Natur vorhandenen Membranen die Beweglichkeit der Anionen in den Kapillarkanälchen der Membran mehr vermindert wird als die der Kationen. Für die Momente der Alteration der Ionenbeweglichkeit in der Membran muss man zwei Bedingungen annehmen. Die erste Bedingung ist die Hydratation der Ionen. Jedes Ion schleppt eine Wasserhülle mit sich, wenn es sich durch das Wasser bewegt. Die Attraktion der Ionen für die Wassermoleküle kann als eine elektrostatische Attraktion der Ionen zu den elektrischen Dipolen interpretiert werden. Die Dipole sind in weiter Ausdehnung rings um das Ion in der Richtung ihrer Achse orientiert und in ihrer lokalen Verteilung festgehalten. Dieser Effekt nimmt mit der Entfernung von dem Ion ab. Wenn ein Ion in einem Kapillarkanälchen sich bewegt, so ist die friktionelle Resistenz erhöht, falls die Sphäre der Attraktion zu den Wassermolekülen die durch Adhäsion an der Wand des Kanälchens festgehaltenen Wassermoleküle erreicht. Die zweite Bedingung ist, dass die Wand des Kapillarkanälchens im allgemeinen mit der elektrischen Doppelschicht bedeckt ist. Die Verlangsamung der Beweglichkeit der Anionen in der Kollodiummembran könnte man auf die negative Ladung dieser Membranen in wässrigen Lösungen zurückführen. Amphotere Membranen, deren elektrische Ladung durch verschiedene Wasserstoffionenkonzentrationen variiert werden kann, zeigen ein ganz anderes Verhalten. Jedenfalls ist der Effekt der Kapillaren, wenn die Bedingungen gegeben sind, nur nach den Anionen oder nur nach den Kationen gerichtet. Wenn die elektrische Ladung der Wand in Betracht gezogen wird, so kann diese Ladung nur durch Adsorption von negativen Ionen zustande kommen, soweit sie negativ geladen ist. Ferner, wenn das Kanälchen eng genug wäre, so könnten sämtliche Anionen von der Wand fixiert werden, und nur die Kationen sich bewegen. Getrocknete Kollodiummembran ist praktisch impermeabel für die Anionen und ein ausgezeichnetes Modell für die Apfelschale. Andererseits ist die Membran der roten Blutkörperchen für Anionen permeabel und für Kationen impermeabel. Man kann von dieser Tatsache aus folgern, dass diese Membran unter physio-

logischen Zuständen positiv geladen ist.

Die dritte Form von Membranpotential ist das sogenannte Donnanpotential. Wenn auf einer Seite der Membran, die für Kolloide nicht durchlässig ist, ein Kolloidelektrolyt wie Albuminchlorid sich befindet, während auf der anderen Seite ein Elektrolyt, z.B. Natriumchlorid, vorhanden ist, so entsteht im Gleichgewichtszustande durch Ionenverteilung in beiden Lösungen ein Potentialunterschied. Der Unterschied dieser Theorie von den anderen ist folgender: Die erst angegebenen zwei Theorien versuchen den Kurs des Potentials von der einen Seite der Membran zu der anderen zu verfolgen. Die Donnantheorie betrifft aber keineswegs den Verlauf des Potentials durch die Membran; sie zieht nur die Differenz zwischen den beiden Seiten der Membran in Betracht. Sie ist also statisch, während die anderen als kinetisch zu betrachten sind. Ebenso wenig überlegt die Donnansche Theorie den Mechanismus der Impermeabilität des betreffenden speziellen Ions. Der Wert des Donnanpotentials ist in physiologischen Flüssigkeiten ziemlich klein, da diese gewöhnlich eine relativ kleine Konzentration von Eiweiss, dagegen eine viel grössere von Salz haben.

Daraus folgt aber nicht, dass diese drei Theorien gegeneinander kontradiktorisch sind. Dass zwei oder alle drei dieser Möglichkeiten in derselben Membran kombiniert sind, kann auch vorkommen. Die Frage ist, welches von diesen Potentialen prädominierend ist. Cremer und später Bauer nehmen an, dass das Diffusionspotential von Bedeutung, die plötzliche Veränderung des Phasengrenzpotentials aber vernachlässigbar ist. Jedenfalls steht die Frage der Potentialdifferenzen, die durch die Membran zwischen zwei Lösungen hervorgerufen sind, in engem Zusammenhang mit dem Problem der Permeabilität der Membran.

Unter verschiedenen Hypothesen über die Permeabilität der Membranen zeichnen sich die von M. Traube begründete Molekularsiebtheorie und die sog. Lipoidtheorie von Overton aus. Dieser nimmt an, dass die physiologische Membran aus fettartiger Substanz besteht, und dass die Membran nur für lipoidlösliche Stoffe durchlässig ist. Da diese Theorie jedoch nicht für alle

Fälle befriedigend war, so schlug Nathanson die Mosaiktheorie vor. Er nimmt an, dass die Membran eine siebähnliche Struktur hat, die aus einem Fachwerk von Lipoiden und aus einer nicht-lipoiden, die Lücken füllenden Lösung besteht.

Sofern aber die diffundierenden Substanzen Elektrolyte sind, ist diese Vorstellung über das Vorhandensein von fettigen Bestandteilen nicht unbedingt notwendig. Und aus welcher Substanz auch das Fachwerk im Sinne von Nathanson bestehen mag, so muss doch die Veränderung der relativen Beweglichkeit der Ionen innerhalb der Membran ein verändertes Diffusionspotential zur Folge haben.

Nun ist für die Hornhaut schon vielfach festgestellt, dass diese für verschiedene Elektrolyte ziemlich gut durchlässig ist. Und da wir jetzt wissen, dass der elektromotorische Konzentrationseffekt bei der Hornhaut im allgemeinen viel kleiner als bei der Apfelschale oder bei getrockneter Kollodiummembran ist, können wir nach der Diffusionstheorie vermuten, dass sie als eine Siebmembran grobporiger als jene zwei ist. Der theoretisch vorstellbare Maximalwert, nämlich für jede Zehnerpotenz des Konzentrationsverhältnisses ca. 58 Millivolt, kann hier niemals, auch nicht annähernd, erreicht werden, da dieser Wert nur dann eintreten würde, wenn für eine Ionenart die Kanälchen der Membran ganz impermeabel sind. Das charakteristische Konzentrationspotential $Cop.$ (d.h. das individuelle Membranpotential bei der Kette von KCl $0,1 n$: $0,01 n$) der Hornhaut ist, wie oben ersichtlich, durchschnittlich ca. 15 Millivolt, entspricht also fast der gleichen Grössenordnung wie Pergamentpapier.

Aus obigen Mitteilungen ist zu ersehen, dass die elektromotorischen Kräfte bzw. Membraneffekte der Hornhaut durch Annahme der Diffusionstheorie ohne besondere Schwierigkeiten zu begreifen sind. Wenn die Verdünntere Lösung der Salze in Gegenwart der Hornhaut ein positiveres Potential hat als bei freier Diffusion, so beruht das auf der relativen Retardierung der Anionenwanderung in der Membran, welche Retardierung weiter auf die negative Ladung der Kapillarwand der Membran zurückzuführen ist. Umgekehrt kann ein negativeres Potential bei einem Überschuss von H-Ionen oder von mehrwertigen Kationen durch relative

Retardierung der Kationenwanderung, die in Folge von Umladung durch diese Kationen selbst zustandekommt, erklärt werden. Diese Umladung habe ich in der Tat durch Elektroendosmoseverfahren festgestellt. Im isoelektrischen Punkt, wo die Ladung null ist, könnte man erwarten, dass die Permëierung jedes Ions nicht von der Kapillarwand beeinflusst würde, und demgemäss das Verhältnis der Wanderungsgeschwindigkeiten der Kationen und der Anionen gleich wie bei freier Diffusion, also der Membraneffekt = Null ist; d. h. Membranpotential = Diffusionspotential. Um die Gültigkeit dieser Annahme zu beweisen, habe ich auch festgestellt, dass der P_H , bei welchem der Membraneffekt der Hornhaut null ist, mit dem durch Quellungsversuch sowie durch Elektroendosmoseverfahren bestimmten isoelektrischen Punkt der Hornhaut identifizierbar ist.

Die chemische Analyse der permëierten Ionen wird von mir in einer bald erscheinenden Publikation behandelt werden. Dieser Beweis ist aber technisch sehr schwierig, weil die chemische Mikroanalyse noch nicht ganz genau ausführbar ist. Da aber die Potentialdifferenz schon durch das Vorseilen einer Art von Ionen zustandekommt, gilt es auch für die Hornhaut, dass die Bestimmung der Membranpotentiale als eine äusserst empfindliche Methode zur Erkennung der Permeabilitätsverhältnisse der Hornhaut für Ionen anzusehen ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Aus den Versuchen an exstirpierten frischen Rinderaugen wurde keine entschiedene Potentialdifferenz zwischen Hornhaut, Kammerwasser und Glaskörper gegen einander konstatiert, wenn deren E.M.K. mit Agarhebern von gesättigten KCl-Kalomelektroden abgeleitet wurden.

2. Wenn man aber die E.M.K. der Hornhaut mit verschiedenen konzentrierten Elektrolytlösungen ableitet, so ergeben sich folgende Besonderheiten:

a) Die zeitliche Veränderung und die individuelle Verschiedenheit der elektromotorischen Kraft sind im allgemeinen bei den verdünnten Elektrolytlösungen gross, dagegen bei den konzen-

trierten klein und der quasistationäre Zustand der E.M.K. kann bei den ersteren erst nach vielen Minuten, bei den letzteren aber viel schneller, schon innerhalb einiger Minuten erreicht werden.

b) Bei den verdünnten Elektrolytlösungen sieht man keine sichere Reihe der Ionenwirkungen und erst bei den konzentrierten die spezielle Wirkung jedes Ions auf die Potentiale. Die Ionenwirkung, wenn sie sich überhaupt bemerkbar macht, ist derart, dass mit steigender Wertigkeit die positivierende Wirkung der Kationen im allgemeinen zunimmt, und ebenso die negativierende Wirkung der Anionen. Abweichend verhalten sich H- und OH-Ionen.

c) Während der Konzentrationseffekt von den Lösungen 0,01 n:0,001 n ohne Ausnahme das positivere Potential der verdünnteren Lösung zeigt, tritt bei der Konzentrationskette von 0,1 n:0,01 n die Umkehrung des Effektes bei CuCl_2 , AlCl_3 und HCl auf, und bei der Konzentrationskette von 1,0 n:0,1 n erscheint diese Umkehrung noch auffallender und umfangreicher.

d) Rinderhornhaut übt bei den Alkalichloriden und Erdalkalichloriden einen positivierenden Einfluss auf die verdünntere Lösung einer Diffusionskette aus. Bei den Chloriden von Cu^{++} und Al^{+++} wird der Membraneffekt fast bis auf Null herabgesetzt, und bei HCl wird dieser stark negativiert. Die Kaliumsalze von SCN , NO_3 und Br erhalten durch die Hornhaut den positivierenden Effekt, und NaOH denselben noch stärker.

3. Wenn eine isolierte frische Hornhaut über die Öffnung eines Glasgefäßes gespannt und innen mit einer konzentrierteren Lösung, aussen mit einer verdünnteren Lösung desselben Elektrolyten abgeleitet wurde, so zeigte der Membraneffekt im grossen und ganzen denselben Sinn wie den mit der Augapfelmethode erhaltenen. Der Membraneffekt ist nämlich durchweg positiv, mit Ausnahme von AlCl_3 und HCl , bei denen er entschieden ins Negative umschlägt.

4. Um den Einfluss der Quellung auf die Membranwirkung auszuschalten, wurden die Membranpotentiale der isolierten formolisierten Rinderhornhaut gemessen. Im wesentlichen war das Resultat dasselbe wie bei isolierter frischer Hornhaut.

5. Die elektrische Ladung der Hornhaut wurde durch Elektroendosmoseverfahren gemessen.

a) *Bei frischer Hornhaut*: Die elektrische Ladung der Hornhaut gegen reines Wasser lässt sich schwer nachweisen. Wenn sie doch einmal erkennbar ist, so scheint die Hornhaut negativ geladen zu sein. In Ringerscher Lösung ist der Ladungssinn negativ. Die Chloride der Alkalimetalle K, Na und Li sowie die der Erdalkalimetalle Mg⁺⁺, Ba⁺⁺ und Ca⁺⁺ geben sämtlich eine negative Ladung. Die Nitrate von Cu⁺⁺ und Th⁺⁺⁺⁺ und die Chloride von Ce⁺⁺⁺ und Al⁺⁺⁺ laden die Hornhaut entschieden positiv, selbst in geringen Konzentrationen. Das H-Ion nimmt eine Sonderstellung ein, dadurch dass es die Membran stark positiviert, sogar in sehr verdünnter Lösung. Variiert man die Anionen bei gleichem Kation K, so sieht man doch stets eine negative Ladung der Membran.

b) *Bei formolisierter Kaninchenhornhaut ergibt sich folgendes*: Sowohl gegen reines Wasser wie gegen Ringerlösung lässt sich eine negative Ladung nachweisen. H⁺, Cu⁺⁺, Al⁺⁺⁺ und Th⁺⁺⁺⁺ geben eine deutliche positive Ladung der Membran.

5) Der isoelektrische Punkt der Hornhaut wurde durch Messung der Membraneffekte beim PH 4,7, durch Elektroendosmoseverfahren beim PH 4,3 und zuletzt durch Quellungsversuch beim PH 4,2 oder PH 4,4 festgestellt.

Es sei mir an dieser Stelle erlaubt, Herrn Professor L. Michaelis für seine wichtigen Ratschläge und den Herren Professoren Ch. Oguchi und T. Komoto für die Mühe des Durchlesens dieses Manuskriptes meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Bauer, E. (1925): Z. Elektrochem., **30**, 514.
 Baumann, (1925): Vortrag in der Deutsch. ophthalm. Gesellschaft in Heidelberg.
 Beutner, R. (1920): Die Entstehung elektrischer Ströme in lebenden Geweben, Stuttgart.
 Cremer, M. (1906): Z. Biol., **47**.
 Donnan, F. (1911): Z. f. Elektrochem., **17**, 572.
 Donnan, F. und Harrio (1911): Journ. of the Chem. Soc., **99**, 1554, zit. nach Höber.

- Gullotta, S. (1926): Arch. di Scienze biol., **8**, 48.
 Haber, F. (1908): Ann. Physik., **26**, series 4, 927.
 Höber, R. (1924): Zeitschr. f. physik. Chem., **110**, 142.
 Loeb, J. (1924): Die Eiweisskörper und die Theorie der kolloidalen Erscheinungen, Berlin.
 Matsuo, I. (1923): Pflügers Arch., **200**, 132.
 Matsuoka, Y. (1927): Chuo-Gankaiho, **19**, 619.
 Michaelis, L. (1925–26): J. Gen. Physiol., **8**, 33.
 Mond, (1924): Pflügers Arch., **196**, 247.
 Nathansohn, A. (1911): Kolloidchem. Beihefte, **11**, 261.
 Nathannsen, (1922): Pflügers Arch., **196**, 637.
 Nernst, W. (1892): Z. f. physik. Chem., **9**, 140.
 Ostwald, (1890): Z. f. physik. Chem., **6**, 71.
 Overton (1902): Pflügers Arch., **92**, 115.
 Overton (1907): Nagels Handb. der Physiol., **2**, 744.
 Traube, M. (1864/66): Zentralbl. f. d. med. Wissensch., **609**, 97 und 113.
 Traube, M. (1867): Arch. f. Physiol., 87 u. 129.

印 檢



CONTENTS TO VOLUME XIX.

No. I, January, 1934.

Page

ISEKI, Toshinori. Zur Kenntnis der Konstitution des Ovomukoides ...	1
ISEKI, Toshinori. Über einige Furanverbindungen der Barbitursäure...	7
KATAOKA, Eisei. Über das Verhalten der Methylprotocatechual- Barbitursäure im Kaninchenorganismus	11
KATAOKA, Eisei. Eine neue Glycerinbestimmung	15
KATAOKA, Eisei. Chemische Zusammensetzung der Schweinethymus...	21
KATAOKA, Eisei. Vergleichende Untersuchung der chemischen Zusam- mensetzung des Pankreas	25
NAKAYAMA, Sadajiro. Zur Kenntnis des Diazoharns. III. Über die chemische Zusammensetzung des Diazoharns bei Scharlach	33
NAKAYAMA, Sadajiro. Zur Kenntnis des Diazoharns. IV. Über die chemische Zusammensetzung des Diazoharns bei Masern	39
KAGIYAMA, Sakae. Über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxyda- tions- und Reduktionsvermögens in den Geweben. (Fünfte Mitteilung.) Über den Einfluss der Keimdrüsen auf das Oxydations- und Reduktions- vermögen in den Geweben	45
KIYOHARA, K. und KAGIYAMA, S. Studien über die Gewebsatmung und die Indophenoloxidasereaktion der serösen Membranen	59
ABE, Minoru. The availability of fructose in the body of normal and diabetic animals	69
KOIKE, Tatsusaburo. Experimentelle Untersuchungen über die Bezieh- ungen verschiedener Zuckerarten sowie zuckerbildender Substanzen zum Blutmilchsäurespiegel	111
HAYASHI, Katsuzo. Untersuchungen über elektrische Erscheinungen an der Hornhaut. I. Mitteilung: Die Potentialdifferenz der Hornhaut gegen Elektrolytlösungen	145
HAYASHI, Katsuzo. Untersuchungen über elektrische Erscheinungen an der Hornhaut. II. Mitteilung: Fortgesetzte Untersuchungen über Poten- tiale an der Hornhaut	165